

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
MARIE-ELAINE LAURIER-LAURIN

INFLUENCE DE L'ACTIVITÉ CÉRAMIDASE ACIDE SUR LA TRANSMISSION
NEURONALE HIPPOCAMPIQUE ET LA PHOSPHORYLATION DE TAU

JUIN 2018

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Il est tout naturel de remercier à la fin d'un long travail de recherche tous ceux qui ont contribué à le rendre possible. Or, c'est avec enthousiasme que je profite de ces quelques lignes pour rendre hommage aux personnes qui ont participé à leur manière à la réalisation de ce mémoire.

Tout d'abord, je souhaite exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de recherche, le Professeur Guy Massicotte. Des qualités scientifiques exceptionnelles mêlées d'une gentillesse extraordinaire ont fait de Guy la clef de voûte de cette démarche scientifique. Ses conseils avisés dans le domaine de l'électrophysiologie neuronale ont fait légion durant cette entreprise, et m'ont permis de découvrir les fabuleux plaisirs de la recherche expérimentale sous ses apparences les plus diverses. Par ailleurs, je n'oublierai jamais son soutien et sa disponibilité dans les moments de doute, notamment lors de la préparation de mon séminaire (moment que je redoutais tant!). Ton soutien a été sans faille et l'expérience du séminaire fut au final une bien belle aventure. Je te serai éternellement reconnaissante d'avoir été au centre de cette réussite.

On m'a récemment demandé dans le cadre de mes études en médecine de dévoiler un exemple de « grand leader ». J'ai instinctivement désigné mon directeur de recherche. J'ai expliqué que plutôt d'imposer une stratégie d'action à son équipe, Guy Massicotte enseigne d'abord à ses étudiants à réfléchir afin que ces derniers puissent déployer pleinement leurs potentiels. Bientôt médecin, j'espère évidemment transmettre avec autant de diligences ma passion pour le domaine de la santé aux membres de mon équipe. Merci pour tout cher Guy.

Je désire évidemment remercier mes collègues étudiants qui, par leur accueil, ont contribué à mon initiation et à mon intégration dans ce monde de la recherche

en neurobiologie. Mes pensées se dirigent en particulier vers : Audrey, Eve, Julie et Suzanne. J'ai naturellement une pensée toute particulière pour toi Audrey. Tous ces instants autour d'un café ont été autant de moments de détente indispensables pour une complète expression scientifique. En plus de partager mes collations rapides, tu as été présente à tout instant pour m'appuyer dans l'apprentissage de techniques biochimiques. C'est également avec plaisir que je remercie le Professeur Marc Germain pour sa disponibilité et sa gentillesse. Je lui suis reconnaissante du temps qu'il m'a accordé. Un grand merci également au Professeur Michel Cyr pour ses conseils avisés tout au long de cette maîtrise. Je me dois de le remercier pour ses multiples discussions informelles reflétant parfaitement sa disponibilité et son plaisir évident de partage.

Mes derniers remerciements iront finalement à ceux qui forment mon noyau familial. Je pense tout d'abord à mes parents sans qui la jeune fille que j'étais ne serait pas devenue la femme que je suis. C'est avec émotion que je leur dévoile le fruit de mes efforts, en espérant être à la hauteur de leur fierté inconditionnelle. Votre présence est (et sera toujours) un des plus beaux cadeaux que la vie m'ait offert! Mes derniers remerciements et non les moindres, s'adressent à mon conjoint Richard, qui pour mon plus grand bonheur partage ma vie de tous les jours et mes expériences professionnelles. Je t'aime!

*C'est avec la persévérance que
vous atteindrez vos plus grands rêves!*

RÉSUMÉ

Les travaux sur la maladie de Farber ont permis de mettre en cause le déficit en enzyme céramidase et l'accumulation de céramides dans la neurodégénérescence caractéristique de cette affection. Dans des études récentes, les chercheurs ont également observé que des niveaux élevés en céramides prédisposent au développement de la démence de type Alzheimer. On sait que le dysfonctionnement neuronal chez les sujets Alzheimer résulte, en partie, d'une hyperphosphorylation de la protéine Tau. Le présent travail s'est intéressé à l'influence potentielle exercée par les céramides sur cette protéine. En inhibant la dégradation endogène des céramides par l'enzyme céramidase, il a été possible de démontrer que la protéine Tau devient hyperphosphorylée à son site Ser262. Non seulement cette hausse de phosphorylation requiert l'ion calcium, mais elle nécessite l'activation d'une protéine kinase, la CamKII dans l'hippocampe; une région du cerveau précocement atteinte par la maladie d'Alzheimer. Sur le plan électrophysiologique, l'accumulation de céramides engendre une hausse de la réponse synaptique médiée par les récepteurs NMDA du glutamate. En s'accumulant dans la cellule, les céramides exerceraient des actions biochimiques susceptibles d'accroître le nombre de récepteurs NMDA à la surface des neurones pour favoriser l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. L'ensemble des observations obtenues dans le cadre de ce travail conduit à penser que les céramides seraient impliqués dans la pathogénèse Alzheimer par un mécanisme dépendant des récepteurs NMDA. Or, il va sans dire que cette découverte présente un intérêt considérable pour la mise au point d'éventuelles approches thérapeutiques susceptibles de retarder les anomalies cognitives chez les sujets Alzheimer. Rappelons que les succès thérapeutiques en cette matière sont particulièrement limités.

Mots-clés : céramides; céramidases; Alzheimer; Farber; GluN2B; récepteurs NMDA; protéine Tau

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	V
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Métabolisme et grandes fonctions des céramides.....	2
1.1 Les enzymes céramidases.....	6
1.2 Implications pathologiques des céramides	8
1.3 Les récepteurs NMDA, excitotoxicité et phosphorylation de Tau	10
CHAPITRE II	
HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	14
CHAPITRE III	
ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	17
3.1 Contribution des auteurs.....	17
3.2 Article scientifique.....	18
Abstract.....	19
Introduction	19
Results	21
ACI Increases NMDA Receptor-Mediated Synaptic Transmission.....	21
ACI Accentuates Tau Phosphorylation at the Ser262 Epitope	23
Tau Hyperphosphorylation is Mediated by Calcium and GluN2B Receptor Activation.....	23
Involvement of CaMKII	24
Discussion	25
Conclusion.....	28
Experimental procedures.....	29
Ethics approval.....	29

Pharmacological agents	29
Hippocampal slices	30
Electrophysiology	30
Western Blotting.....	31
Antibodies	32
Statistical analysis.....	32
Acknowledgments.....	32
Figure Legends and Figures	33
References.....	42
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	47
4.1 Anomalies cellulaires et céramides.....	48
4.2 Céramides et récepteurs NMDA	51
4.3 Plasticité neuronale et céramides.....	53
CHAPITRE V	
CONCLUSION	55
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	58

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Représentation schématique du métabolisme des céramides.....	4
1.2	Action des céramidases.....	6
1.3	Structure chimique du D-NMAPPD.....	7
1.4	Représentation schématique de la protéine Tau	11
1.5	Localisation des récepteurs NMDA.....	13
2.1	L'hippocampe comme modèle expérimental.....	15
5.1	Céramides et neuropathologies	57

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMPA	Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionate
AP-2	Adaptor Protein 2
Bad	Bcl2-Antagonist of cell Death
BCR	B Cell Receptor
CA	Corne d'Ammon
CamKII	Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase II
Cdk5	Cyclin-Dependent Kinase 5
CerS	Céramide Synthase
Cox2	Cyclo-Oxygénase 2
D-NMAPPD	N-[(1R,2R)-2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-2-(4-nitrophenyl)ethyl]-tetradecanamide
Fas	Fatty Acid Synthase
fEPSPs	Field Excitatory PostSynaptic Potentials
GluN1	Glutamate N1
GluN2A	Glutamate N2A
GluN2B	Glutamate N2B
HL-60	Human promyelocytic Leukemia cells
LTP	Long Term Potentiation
MBD	Microtubule Binding Domain
NF- κ B	Nuclear Factor-Kappa B
NMDA	N-méthyl-D-Aspartate
pH	Potentiel de l'Hydrogène

PI3K-AKT	Phosphatidylinositol-bisphosphate 3-Kinase et Protéine Kinase B
PKC	Protéine Kinase C
PLT	Potentialisation à Long Terme
PSD	Post Synaptic Density
Tau	Tubule-Associated Unit
Tyr	Tyrosine
Ser	Sérine
Sr	Stratum Radiatum

CHAPITRE I

INTRODUCTION

La perte des cellules neuronales est un phénomène intrinsèque de l'évolution de nombreuses pathologies affligeant le système nerveux. Or, on sait maintenant que les mécanismes délétères sous-jacents aux affections neurodégénératives impliquent vraisemblablement l'intervention de molécules chimiques produites par le tissu nerveux, allant des neurotransmetteurs endogènes aux messagers intracellulaires. Les céramides, des seconds messagers lipidiques normalement produits par les cellules, sont actuellement mis en cause dans les maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer (Kaya et al., 2017a; Mielke et al., 2012; Noel et al., 2017) et la maladie de Parkinson (Doroudgar and Lafleur, 2017; Ferrazza et al., 2016). L'implication néfaste des céramides est dominante, par ailleurs, chez les jeunes patients souffrant de la maladie de Farber, une affection très rare qui se manifeste à la naissance par une incapacité des cellules à produire une enzyme lysosomale indispensable à l'épuration intracellulaire de ces métabolites lipidiques. Le déficit enzymatique porte essentiellement sur la céramidase dite acide (Dulaney et al., 1976; Nivaggioni et al., 2016; Yu et al., 2018). En absence de cette enzyme, une accumulation excessive de céramides se produit dans l'organisme, en particulier, au niveau du tissu nerveux. Dans la forme classique de la maladie, les symptômes neurologiques apparaissent dès les premières semaines de vie avec un retard de développement psychomoteur et des troubles de la déglutition. La maladie est malheureusement irréversible, voire fatale (Cappellari et al., 2016; Zielonka et al., 2017).

Malgré l'avancement des connaissances, les mécanismes initiateurs sous-jacents à la neurodégénérescence induite par l'accumulation de céramides restent méconnus. L'hypothèse avancée par plusieurs experts du domaine de la

neurobiologie est que la mort des neurones dans diverses affections résulte de l'action néfaste d'un neurotransmetteur endogène, le glutamate (Fanani and Maggio, 2017; Girling et al., 2018). Le concept en question sous-tend que la transmission neuronale excitatrice médiée par le glutamate peut, dans certaines conditions, favoriser l'apparition de lésions pathologiques irréversibles dans le cerveau (Norris et al., 2006; Rueda et al., 2016; Tanovic and Alfaro, 2006; Xu et al., 2016). Or, rappelons que pour les neurobiologistes, l'action néfaste exercée par le glutamate sur les neurones impliquerait fort probablement une activation excessive des récepteurs synaptiques de type NMDA (Belousov and Fontes, 2016; Punnakal and Dominic, 2018; Rothman and Olney, 1995; Sun et al., 2016). La protéine Tau, surtout connue pour son implication dans la maladie d'Alzheimer, est d'ailleurs hautement régulée par ces récepteurs (NMDA) du glutamate (Sun et al., 2016).

Les études effectuées dans cadre du présent mémoire tenteront de vérifier l'hypothèse que les neurones exposés aux céramides présentent une réponse accrue des récepteurs NMDA. Un phénomène qui pourrait logiquement impliquer une hyperphosphorylation de la protéine Tau dans les neurones. Certes de nature fondamentale, la recherche proposée dans ce mémoire devrait accroître nos connaissances sur les causes du dysfonctionnement neuronal survenant à la suite d'une production accrue en céramides. Elle pourrait également fournir des informations indispensables favorisant la mise au point de stratégies thérapeutiques novatrices capables de contrer les effets délétères de ces médiateurs lipidiques dans diverses conditions pathologiques comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de Farber.

1.1 Métabolisme et grandes fonctions des céramides

Comme plusieurs autres intermédiaires bioactifs, les céramides font partie intégrante de la voie métabolique des sphingolipides. Ce groupe de messagers lipidiques compte plus de 50 molécules différentes se distinguant de par la longueur

de leur chaîne hydrocarbonée (Fanani and Maggio, 2017). Les céramides sont considérés comme un point de convergence métabolique, car ils occupent une position centrale dans la biosynthèse et le catabolisme des sphingolipidiques assurant, du coup, un rôle de précurseur pour de nombreuses molécules bioactives comme la sphingosine et la sphingosine-1-phosphate (Czubowicz and Strosznajder, 2014; Kihara, 2016; Ogretmen, 2018). Ils sont donc les chefs d'orchestre des sphingolipides et peuvent être générés dans la cellule par différentes voies métaboliques (Okabe and Kishimoto, 1977; Zheng et al., 2006). La connaissance du métabolisme des sphingolipides a progressé grâce à l'identification et au clonage des différentes enzymes impliquées dans le métabolisme de ces médiateurs lipidiques (Heung et al., 2004; Huitema et al., 2004).

Les céramides sont principalement formés par deux voies métaboliques distinctes: la voie de synthèse *de novo* initiée par la condensation de la sérine et du palmitoyl CoA et conduisant, par une cascade de réactions enzymatiques, à la formation de céramide dans le réticulum endoplasmique, ou bien la voie dépendante de la sphingomyélinase membranaire. Dans une moindre mesure, les céramides sont produits par une « voie de recyclage » où la sphingosine est formée dans les lysosomes/endosomes tardifs par hydrolyse des céramides, issus de la dégradation de sphingolipides complexes (sphingomyéline et glycosphingolipides) (Bartke and Hannun, 2009; Gangoiti et al., 2010; Testai et al., 2015). En approfondissant le métabolisme des céramides, les chercheurs ont pu démontrer que les enzymes céramides synthases (CerS) jouent un rôle primordial dans la production des différentes espèces moléculaires de céramides; lesquelles se présentent avec des chaînes carbonées plus ou moins longues allant de 14 à 26 atomes de carbones. Sur le plan biochimique, il a par ailleurs été démontré que six isoformes de CerS (CerS1-6) interviennent dans la production de céramides (Mullen et al., 2012).

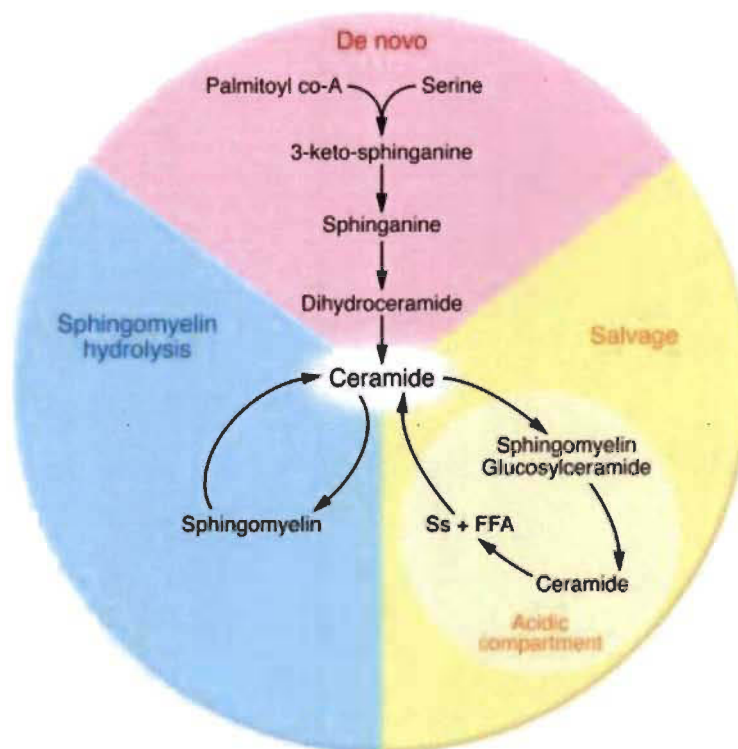


Figure 1.1 Représentation schématique du métabolisme des céramides.

Les céramides intracellulaires dérivent essentiellement de deux grandes voies métaboliques. Une première dite *de novo* et une seconde impliquant l'hydrolyse de la sphingomyéline par la sphingomyélinase. Les céramides sont également issus par une voie de recyclage acide (salvage) (Tirée de : Bikman and Summers, 2011).

On le sait aujourd'hui, les céramides sont des seconds messagers indispensables assurant de nombreux processus biologiques tels que l'induction de l'apoptose, de la différenciation, l'inhibition de la prolifération et la régulation des processus inflammatoires (Ogretmen, 2018; Uchida, 2014). De plus, ils sont considérés comme des médiateurs centraux coordonnant la réponse au stress chez les eucaryotes (Chen et al., 2015; Pfeilschifter and Huwiler, 2000). L'augmentation des céramides intracellulaires par ajout de formes exogènes à courtes chaînes (Obeid et al., 1993) ou par stimulation de leur synthèse par addition de sphingomyélinase bactérienne (Jarvis et al., 1994) induit l'apoptose chez des cellules HL-60. Par ailleurs, les céramides sont vraisemblablement des médiateurs de l'apoptose induite par les cytokines dont le $\text{TNF}\alpha$ (par la voie FAS ou par le récepteur BcR des lymphocytes B) (Bartke and Hannun, 2009; Jana et al., 2009; Jarvis et al., 1994; Obeid

et al., 1993; Yadav and Tiwari, 2014), par les rayonnements ultraviolets (Reich and Medrek, 2013), ou encore par les agents antinéoplasiques comme la daunorubicine (Jaffrezou et al., 1996). En général, les céramides induisent l'apoptose en amont de la voie mitochondriale en inhibant la voie de signalisation PI3K-Akt et en déphosphorylant la protéine Bad (un membre de la famille Bcl-2), ce qui aboutit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et au relargage de médiateurs apoptotiques (Lin et al., 2007; Stoica et al., 2003; Ueda, 2015).

Les céramides peuvent aussi induire l'apoptose en activant la protéase Cathepsin D (De Stefanis et al., 2002; Lin et al., 2016) qui couple la sphingomyélinase lysosomale à la voie mitochondriale d'apoptose en réponse au $\text{TNF}\alpha$ (Heinrich et al., 2004). Ils peuvent également s'accumuler dans diverses situations de différenciation cellulaire: lors de la différenciation de la lignée pro-myéloïde HL-60 provoquée par une déplétion en sérum (Jayadev et al., 1995) ou par la vitamine D3 (Bini et al., 2012; Okabe and Kishimoto, 1977; Okazaki et al., 1990) lors de la différenciation myogénique induite en réponse à l'hormone antidiurétique dans les cellules L6 (Mebarek et al., 2007) et lors de la différenciation monocyttaire résultant de l'influence des cytokines comme l'interféron gamma (Kim et al., 1991). Sur le plan structural, les céramides contribuent à l'ordonnancement lipidique des membranes cytoplasmiques affectant du coup leur perméabilité (Paloncyova et al., 2015; Ruvolo, 2003; Skolova et al., 2016). Par ailleurs, les membranes biologiques présentent des domaines aux propriétés particulières, moins fluides, où les lipides sont organisés en phase et donc insolubles dans les détergents à froid. Ces microdomaines ou « radeaux lipidiques » présents dans la bicouche membranaire sont enrichis en céramides et en cholestérol. Ils servent de plateformes de signalisation régulant la disponibilité des récepteurs et autres protéines transmembranaires (Mencarelli and Martinez-Martinez, 2013; Wang and Klauda, 2017).

1.1 Les enzymes céramidases

Les céramidases sont les enzymes se situant au centre de la dégradation des céramides excédentaires en dérivés fonctionnels comme la sphingosine et des acides gras (Figure 1.2). Ces enzymes sont nommées selon leur pH optimal d'action soit céramidase alcaline, neutre ou acide; cette dernière étant active principalement dans les lysosomes et présente une expression ubiquitaire relativement élevée (Saied and Arenz, 2014). Les souris déficientes pour le gène codant pour cette enzyme présentent toutefois un phénotype létal (Eliyahu et al., 2007) car elles développent une dysfonction multisystémique dès le tout jeune âge (Sikora et al., 2017). Sa déficience chez l'humain a clairement été mise en cause dans la maladie de Farber et plus récemment dans une forme rare d'atrophie musculaire d'origine spinale (Schuchman, 2016).

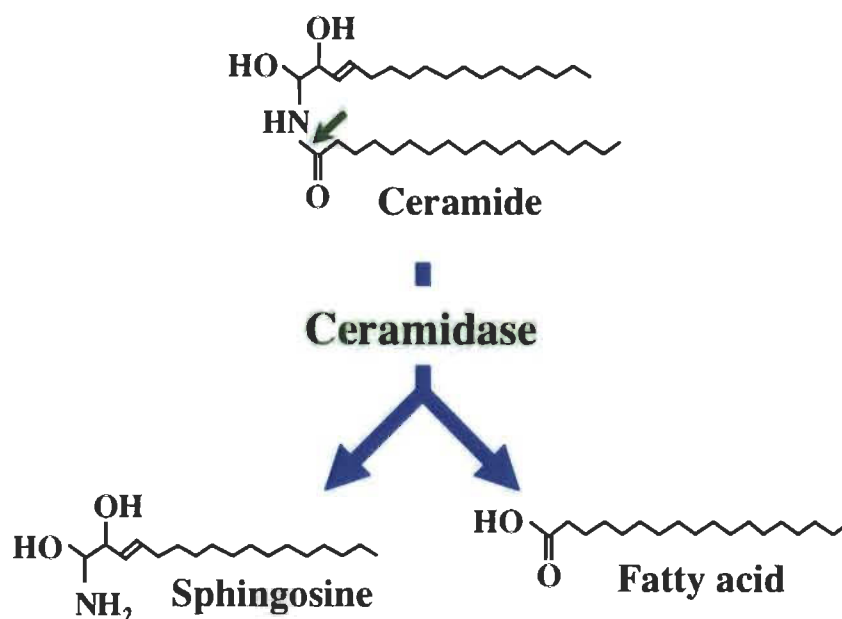


Figure 1.2 Action des céramidases.

Les céramides excédentaires sont éliminés par l'action des enzymes céramidases pour donner la sphingosine et un acide gras (Source : Custom Mempro, 2005).

La céramidase neutre est située au niveau de la membrane plasmique. Son pH optimum est de 7 et elle assure par son activité la protection des cellules contre l'apoptose induite par le TNF- α (Ito et al., 2014; Osawa et al., 2005). La céramidase alcaline agit à un pH situé entre 8,5 et 9,5. Elle se présente sous trois formes distinctes. Celle de type 1, essentiellement exprimée au niveau de la peau, posséderait la capacité de réguler le cycle cellulaire et la différenciation des kératinocytes. La céramidase alcaline de type 2 serait quant à elle impliquée dans la survie cellulaire (Sun et al., 2010) alors que la céramidase alcaline 3 serait engagée dans la prolifération et l'apoptose (Coant et al., 2017).

Sur le plan pharmacologique, divers composés analogues des céramides ont été identifiés comme agents inhibiteurs des enzymes céramidases. Par exemple, le composé N-[(1R, 2R)-2-hydroxy-1-(hydroxyméthyl)-2-(4-nitrophényl)éthyl]-tétradécanamide (appelé D-NMAPPD) possède une forte propension à inhiber la céramidase de type acide trouvée dans les lysosomes (Figure 1.3). Or, par sa capacité à élever les taux endogènes de céramides, l'inhibiteur en question serait à même de limiter la progression des cellules cancéreuses, et ce, par des processus variés impliquant l'apoptose de même que la prolifération de certaines cellules comme les kératinocytes (Raisova et al., 2002).

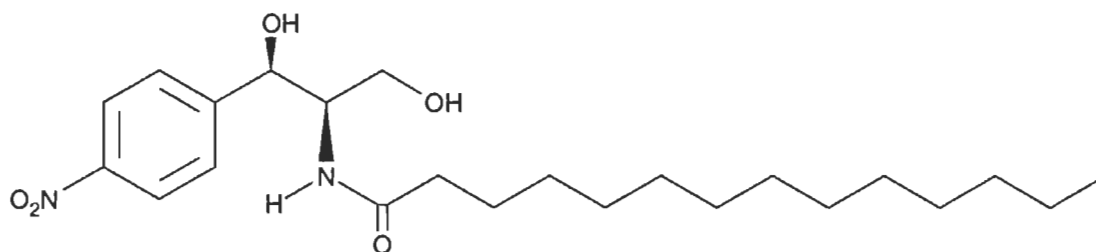


Figure 1.3 Structure chimique du D-NMAPPD.

Le D-NMAPPD est un analogue chimique des céramides possédant une action inhibitrice sur la céramidase acide contenue principalement dans les lysosomes (Source : Cayman Chemical, 2010).

1.2 Implications pathologiques des céramides

Les pathologies humaines pour lesquelles l'effet des céramides est le mieux documenté sont la résistance à l'insuline (Broskey et al., 2018; Kitessa and Abeywardena, 2016), l'inflammation (Ghidoni et al., 2015) et le cancer (Huang and Freter, 2015). Par exemple, on sait que l'obésité prédispose les individus au développement de la résistance à l'insuline, au niveau du foie et du muscle. Divers mécanismes sont proposés pour expliquer comment l'excès d'adiposité s'oppose à l'action de l'insuline. Premièrement, quand la capacité de stockage du tissu adipeux est dépassée, les graisses s'accumulent dans des tissus non adaptés, ce qui induit la formation de métabolites inhibiteurs de la signalisation de l'insuline. Par ailleurs, l'obésité déclenche un état d'inflammation chronique, et les cytokines libérées par le tissu adipeux ou les macrophages qui y sont infiltrés inhibent l'action de l'insuline. Dans les deux cas, les céramides semblent impliqués (Summers, 2006) et l'ensemble des données obtenues sur le sujet tentent à indiquer que la piste des céramides doit être considérée pour la prise en charge des complications cardiovasculaires et métaboliques associées au développement de la résistance à l'insuline chez les sujets obèses (Abursayn et al., 2016; Laaksonen et al., 2016).

Par ailleurs, un des effets des céramides est d'activer le facteur de transcription NF- κ B qui est impliqué dans la mise en œuvre de la réponse inflammatoire en induisant, entre autres, l'expression d'enzymes pro-inflammatoires comme la cyclo-oxygénase 2 (COX2) (Sarkar et al., 2004). Plus récemment, les céramides ont été identifiés comme acteurs centraux participant à la régulation des processus inflammatoires induits par l'interleukine-1 (Shi et al., 2016) et la migration des macrophages (Ordonez et al., 2016; Ouro et al., 2014). En ce qui a trait au cancer, on suspecte que le développement de la résistance aux drogues de certaines tumeurs trouve son origine dans un défaut de l'accumulation des céramides, ce qui favoriserait la progression tumorale (Ogretmen, 2018; Zhang et al., 2018). Par exemple, les lignées cellulaires résistantes à l'adriamycine et KB-V-1 résistantes à la vinblastine, présentent la particularité d'avoir des taux de céramides endogènes

très bas en raison d'une forte activité glucosylcéramide synthase (Lavie et al., 1996; Lucci et al., 1999). Les céramides seraient également au centre des mécanismes assurant la protection de l'organisme contre divers cancers, comme ceux du poumon, de par leurs effets régulateurs de l'apoptose et de l'autophagie (Morad et al., 2013). Toutefois, il a été récemment démontré que l'accumulation de céramides endogènes résultant de la perte d'activité en céramidase alcaline de type 3 serait à même d'accentuer le risque de développer une tumeur au colon (Wang et al., 2016).

Les enquêtes portant sur l'influence néfaste des céramides au niveau du tissu nerveux font l'objet de nombreuses investigations. Au cours des dix dernières années, les études ont notamment convergé vers l'implication des céramides dans le développement des maladies neurodégénératives chroniques. Chez la souris, par exemple, l'accumulation de céramides dans le cortex a été mise en cause lors du vieillissement du cerveau. L'augmentation la plus drastique s'observe pour la galactosylcéramide dont le niveau est environ 300 fois supérieur chez les animaux âgés de 25 mois comparés aux animaux de 3 mois (Cutler et al., 2004). Fait intéressant, l'accumulation excessive de la galactosylcéramide semble être associée à l'apparition des dommages neuronaux typiques des cerveaux Alzheimer (Hejazi et al., 2011). Il s'agit, en réalité, de lésions histopathologiques caractérisées par des amas extracellulaires d'amyloïdes et d'une dégénérescence neurofibrillaire intracellulaire (Haughey et al., 2010; Jazvinscak et al., 2015; Kaya et al., 2017b). Lorsque des neurones d'hippocampe mis en culture sont exposés à la protéine β -amyloïde, les céramides s'accumulent dans les neurones, suggérant que ces médiateurs lipidiques exercent un rôle essentiel dans la toxicité exercée par le peptide β -amyloïde dans les cerveaux Alzheimer (Miller et al., 2009).

L'étude de Michelle Mielke de la Clinique Mayo (Rochester) a donné un éclairage impressionnant sur la contribution des céramides dans la maladie d'Alzheimer (Mielke et al., 2012). En effet, cette étude tente de démontrer que les femmes possédant de hautes concentrations de céramides dans le sang présentent un risque dix fois plus important que la normale de développer une démence de type

Alzheimer. Selon des travaux récents, les céramides pourraient être mis en cause dans l'apparition des troubles cognitifs chez les sujets Alzheimer, et ce, de par la capacité de ces médiateurs lipidiques à entretenir le déficit cholinergique (Dontigny et al., 2012). L'observation que les céramides sont en mesure de perturber la formation de la plasticité électrophysiologique hippocampale (c.à.d. la PLT) est assurément un autre indice de la capacité de ces médiateurs lipidiques à perturber le fonctionnement du cerveau (Maalouf and Rho, 2008; Wang et al., 2017). Outre l'Alzheimer, des perturbations pathologiques en céramides ont également été proposées pour expliquer les anomalies neuronales survenant dans d'autres affections neuropathologiques chroniques comme la maladie de Parkinson (Mielke et al., 2013) et la sclérose latérale amyotrophique (Vidaurre et al., 2014; Wrenger et al., 1982).

1.3 Les récepteurs NMDA, excitotoxicité et phosphorylation de Tau

Les travaux de ces 40 dernières années apportent de nombreux arguments pour un rôle important du glutamate dans les processus cognitifs, en particulier la mémoire, notamment par l'intermédiaire de la potentialisation à long terme (PLT). Fait ironique, on attribue à ce neurotransmetteur excitateur des effets potentiellement toxiques mettant en œuvre le processus d'excitotoxicité et, conséquemment, la mort neuronale. La mise en jeu préférentielle de certains récepteurs au glutamate, comme les récepteurs NMDA, apparaît déterminante dans le développement des processus de la mort cellulaire dans des conditions pathologiques variées allant de l'ischémie cérébrale (Dhawan et al., 2011) à l'épilepsie (Lopes et al., 2013; Punnakkal and Dominic, 2018) en passant par la maladie d'Alzheimer (Gonzalez et al., 2015; Ong et al., 2013; Rammes et al., 2017) et la sclérose latérale amyotrophique (Jiang et al., 2017; Madji Hounoum et al., 2016).

L'activation de ces récepteurs, au-delà des effets excitotoxiques qu'elle entraîne, serait également à même d'augmenter la phosphorylation de la protéine

Tau; un phénomène caractéristique de plusieurs situations neuropathologiques (De Montigny et al., 2013; Li et al., 2014). Selon toute vraisemblance la phosphorylation précoce du résidu Ser262 dans le domaine de liaison aux microtubules (ou MBD) de la protéine Tau constituerait une étape clef de la pathologie Alzheimer (Figure 1.4). En résulteraient, du coup, un détachement de cette protéine du réseau microtubulaire et l'apparition subséquente de la neurodégénérescence dite fibrillaire (Fischer et al., 2009; Iijima et al., 2010; Ikura et al., 1998; Lauckner et al., 2003; Song and Yang, 1995). De nombreuses enzymes phosphorylantes, nommées kinases, sont soupçonnées d'accroître la phosphorylation de la protéine Tau via l'activation des récepteurs NMDA (Li et al., 2004; Tell and Hilgeroth, 2013). Sur ce plan, les travaux des chercheurs braquent résolument les projecteurs sur les kinases GSK3, Cdk5, PKC et CamKII.

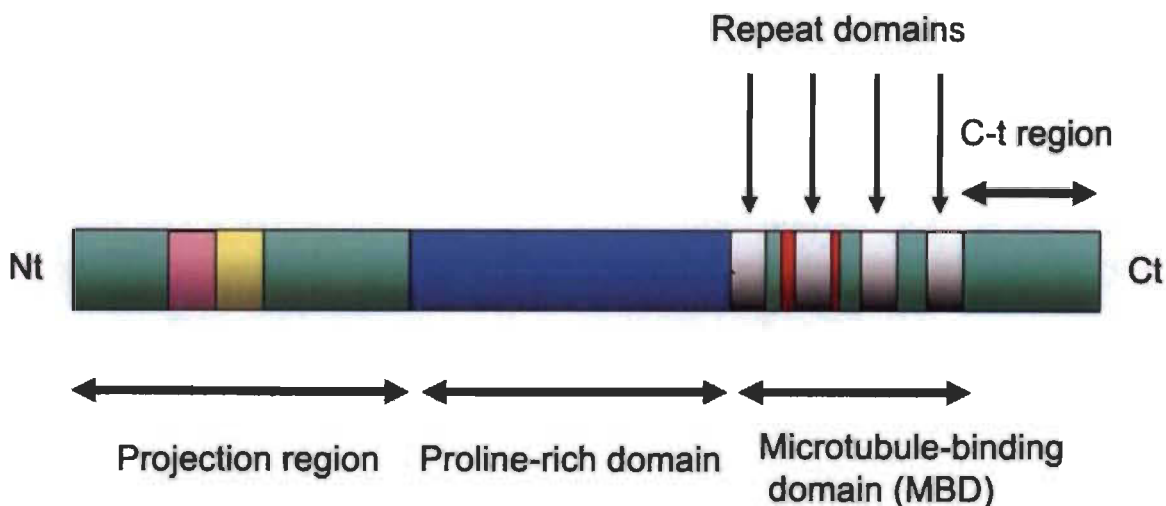


Figure 1.4 Représentation schématique de la protéine Tau.

De manière générale la protéine Tau compte 4 régions distinctes comptant près de 80 résidus phosphorylés sensibles aux enzymes kinases (et phosphatases également) (Tirée de : Wang et al., 2014).

Les récepteurs NMDA sont des canaux ioniques exprimés abondamment dans le système nerveux central avec une préférence pour la région hippocampale (Lee and Kesner, 2002). Ils sont sensibles aux acides aminés excitateurs comme le glutamate et, plus particulièrement, au dérivé pharmacologique qu'est le N-méthyl-D-aspartate (d'où NMDA). Ces récepteurs sont formés de quatre sous-unités,

deux sous-unités GluN1 obligatoires s'associant à deux autres sous-unités complémentaires (GluN2A ou GluN2B). L'agoniste naturel des récepteurs NMDA est le glutamate endogène, lequel se fixe essentiellement avec les sous-unités GluN2 (A et B). Les études de la biophysique neuronale indiquent toutefois que l'activation des récepteurs NMDA requiert, en plus du glutamate, la liaison d'un co-agoniste, la glycine. Une fixation qui n'intéresse alors que les sous-unités GluN1. L'ouverture des canaux survient, suite à la liaison de ces deux ligands, en plus de la dépolarisation de la membrane du neurone (Blanke and VanDongen, 2009; Newcomer et al., 2000; Vyklicky et al., 2014).

À ce jour, les observations fonctionnelles nous indiquent que c'est la quantité d'ions calcium qui assure le pouvoir excitotoxique du glutamate dans le cerveau. Or, les études sur le sujet montrent que les sous-unités GluN2B constituent l'élément clef de la toxicité glutamatergique. De façon générale, les données expérimentales tentent de démontrer que les récepteurs GluN2A situés dans la densité postsynaptique génèrent les effets bénéfiques du glutamate sur le cerveau, alors que les effets néfastes eux sont le fruit d'une stimulation intempestive des mêmes récepteurs se trouvant dans les compartiments extrasynaptiques (Garcia-Munoz et al., 2015; Gardoni et al., 2009; Loftis and Janowsky, 2003; Petralia, 2012; Zhou et al., 2015a; Zhou et al., 2015b) (Figure 1.5).

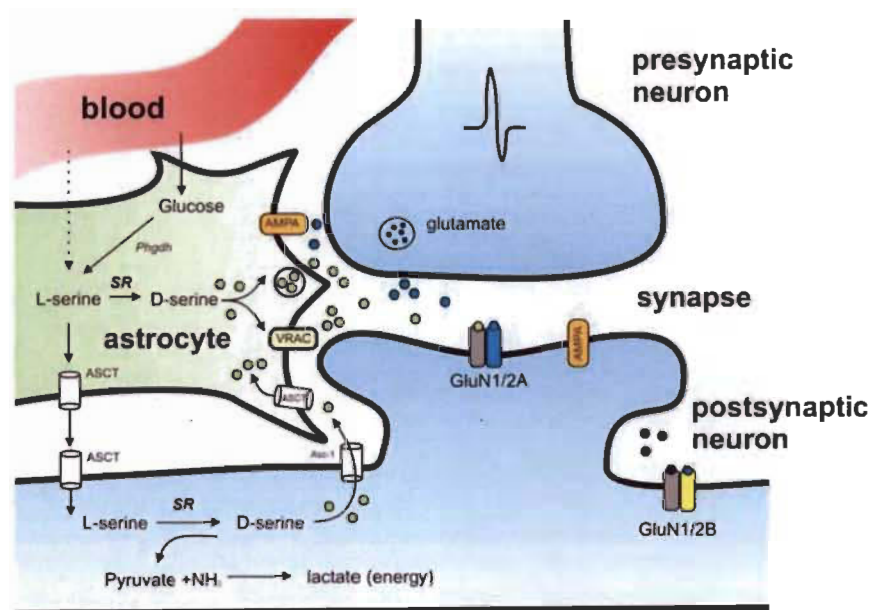


Figure 1.5 Localisation des récepteurs NMDA.

Les récepteurs NMDA présentent une localisation préférentielle dans le tissu nerveux. Alors que les récepteurs GluN2A se concentrent principalement dans la densité postsynaptique (PSD), alignée avec la terminaison nerveuse, les récepteurs GluN2B se trouvent quant à eux concentrés dans la portion éloignée de la synapse (région extrasynaptique) (Tirée de : Van Horn et al., 2013).

Comme bien d'autres protéines, la présence de récepteurs GluN2B à la surface des neurones est contrôlée par des processus de phosphorylation. Par exemple, les récepteurs GluN2B contiennent trois sites de phosphorylation ciblés par la protéine kinase Fyn (Tyr1252, Tyr1336 et Tyr1472). Sur le plan physiologique, le résidu Tyr1472 apparaît comme un site préférentiel de phosphorylation empêchant l'endocytose du récepteur et, subséquemment, son accumulation à la surface des neurones via un mécanisme impliquant l'adaptine-2 (AP-2) (Lavezzari et al., 2003; Roche et al., 2001; Schweitzer et al., 2017). La phosphorylation des résidus Ser1480 de la sous-unité GluN2B aurait également pour effet de réduire l'expression des récepteurs NMDA à la surface des membranes (Chung et al., 2004; Strong et al., 2014).

CHAPITRE II

HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

Depuis quelques années déjà, on suspecte que l'accumulation de céramides contribue à la mort neuronale dans diverses situations neuropathologiques. Or, les recherches portant sur les mécanismes d'action délétères des céramides font l'objet de nombreuses investigations. Dans le cadre du présent mémoire, on s'intéressera à élucider l'hypothèse voulant que les céramides endogènes générés à la suite de l'inhibition de la céramidase acide puissent contribuer à accroître l'activité des récepteurs NMDA du glutamate et, conséquemment, à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. Rappelons-le, les récepteurs NMDA sont des acteurs indispensables contribuant à la formation des mécanismes d'excitotoxicité, notamment, dans la région dite hippocampale du cerveau (Girling et al., 2018; Huo et al., 2015; Serpa et al., 2015). Découlent de cette hypothèse générale trois objectifs de recherche qui tenteront de répondre aux questions suivantes :

Est-ce que l'inhibition de la céramidase acide par le D-NMAPPD a pour effet d'accentuer les réponses physiologiques des récepteurs NMDA dans l'hippocampe?

On sait que la région hippocampale est préférentiellement affectée dans plusieurs conditions neuropathologiques. Le premier volet expérimental de ce travail s'appliquera à estimer les effets apportés par l'inhibiteur de l'enzyme céramidase acide sur la modulation des réponses glutamatergiques de type NMDA sur des tranches isolées maintenues artificiellement en vie dans une chambre d'incubation. Cette question sera abordée en effectuant des enregistrements électrophysiologiques au niveau de la région CA1 de l'hippocampe, plus spécifiquement dans la portion synaptique du stratum radiatum (Figure ci-dessous).

Les potentiels postsynaptiques excitateurs de champs (fEPSPs) de type NMDA seront isolés pharmacologiquement et comparés à ceux enregistrés suite à l'activation des récepteurs de type AMPA, une autre famille de récepteurs au glutamate assurant la transmission synaptique.

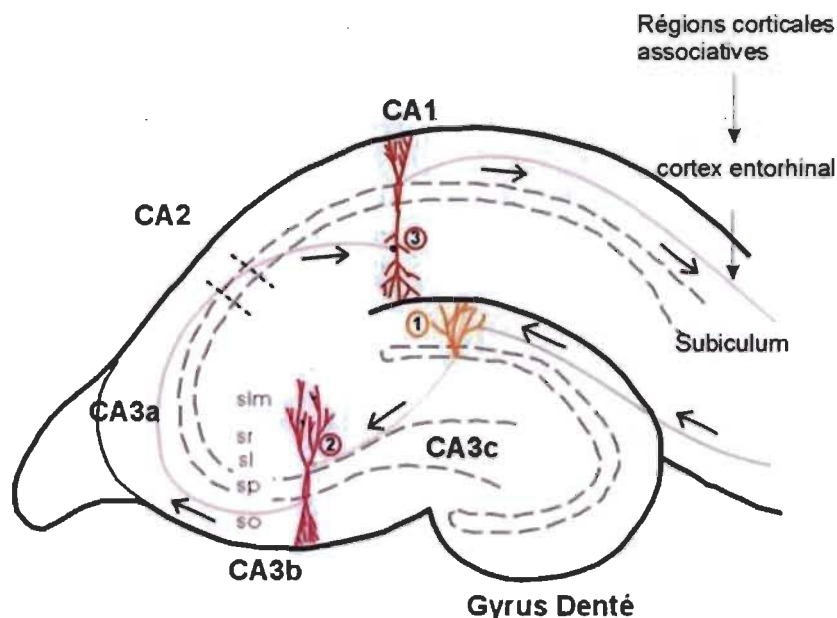


Figure 2.1 L'hippocampe comme modèle expérimental.

L'hippocampe est formé par l'association de deux structures, le gyrus denté et la corne d'Ammon qui se subdivise elle-même en différents secteurs (CA1 à CA3). C'est dans la zone du stratum radiatum (sr) du secteur CA1 que les enregistrements électrophysiologiques seront réalisés (voir chiffre 3, encerclé) (Tirée de : Igraine Leray, SlidePlayer, 2014).

Est-ce que la phosphorylation des récepteurs GluN2B du glutamate est affectée par l'application du D-NMAPPD sur l'hippocampe?

La neurochimie a récemment braqué les projecteurs sur les récepteurs GluN2B du glutamate, lesquels se présentent comme des acteurs fondamentaux de la dégénérescence neuronale (Karthick et al., 2016; Leaver et al., 2008; Lu et al., 2018). Or, qu'en est-il de l'influence des céramides sur les propriétés biochimiques de ces récepteurs glutamatergiques dans l'hippocampe? En utilisant la méthode

d'immunobavardage de type Western et des anticorps spécifiques, le second volet de ma recherche tentera d'évaluer la possibilité que les céramides générés par l'action de l'inhibiteur D-NMAPPD soient en mesure d'induire un changement de l'état de phosphorylation des récepteurs GluN2B. La spécificité de l'effet potentiel de cet inhibiteur sur les récepteurs NMDA sera également étudiée en évaluant une autre sous-unité importante contribuant à la formation de récepteurs NMDA fonctionnels, la sous-unité GluN1.

Est-ce que la phosphorylation de la protéine Tau est également altérée par l'application du D-NMAPPD sur l'hippocampe?

Les études biochimiques conduisent à penser que l'activation intempestive des récepteurs NMDA peut contribuer à l'état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau, laquelle devient alors toxique pour le cerveau (Allyson et al., 2010; Xu et al., 2015). Or, le troisième et dernier volet expérimental de ce projet consistera à déterminer la possibilité que l'inhibiteur de l'enzyme céramidase acide soit à même de modifier la phosphorylation de certains épitopes de la protéine Tau : Ser199/202, Ser262 et Ser396. Sur le plan expérimental, les niveaux de phosphorylation des épitopes en question seront estimés ici encore par la technique d'immunobavardage de type Western sur des échantillons de protéines d'hippocampes de rats, préalablement traitées avec le D-NMAPPD. Dans l'éventualité d'un effet observable, nous comptons évidemment déterminer les mécanismes en cause avec une emphase portée sur l'implication du calcium et de certaines protéines kinases activées par les récepteurs NMDA et connues pour cibler la protéine Tau.

CHAPITRE III

ARTICLE SCIENTIFIQUE

3.1 Contribution des auteurs

Cet article scientifique a fait l'objet d'une publication dans la revue *Neural Plasticity*. Étant la première auteure du manuscrit, j'ai rédigé l'article avec l'aide précieuse de mon directeur de recherche, le professeur Guy Massicotte. De plus, le professeur Michel Cyr a contribué avec mon directeur de recherche à l'ébauche conceptuelle du projet. Enfin mes collègues Audrée De Montigny et Suzanne Attiori ont contribué à la mise au point de techniques requises pour la réalisation de la démarche expérimentale retenue.

3.2 Article scientifique

Blockade of Lysosomal Acid Ceramidase Induces GluN2B-Dependent Tau Phosphorylation in Rat Hippocampal Slices

Marie-Elaine LAURIER-LAURIN, Audrée DE MONTIGNY, Suzanne ATTIORI ESSIS,
Michel CYR and Guy MASSICOTTE

Département de biologie médicale
Université du Québec à Trois-Rivières
Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Number of pages: 33

Number of figures: 6

Number of words: 6188

Corresponding author's address: **Guy Massicotte, Ph.D.**

Département de biologie médicale
U.Q.T.R. C.P. 500
Trois-Rivières, Québec
Canada G9A 5H7
Telephone: (819) 376-5053
Fax: (819) 376-5084
E-mail: Guy.Massicotte@uqtr.ca

Abstract

The lysosomal acid ceramidase, an enzyme known to limit intracellular ceramide accumulation, has been reported to be defective in neurodegenerative disorders. We show here that rat hippocampal slices, preincubated with the acid ceramidase inhibitor (ACI) d-NMAPPD, exhibit increased N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) in CA1 synapses. The ACI by itself did not interfere with either paired pulse facilitation or alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA) receptor-mediated fEPSPs, indicating that its influence on synaptic transmission is postsynaptic in origin and specific to the NMDA subtype of glutamate receptors. From a biochemical perspective, we observed that Tau phosphorylation at the Ser262 epitope was highly increased in hippocampal slices pre-incubated with the ACI, an effect totally prevented by the global NMDA receptor antagonist D/L(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP-5), the calcium chelator 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA) and the GluN2B (but not the GluN2A) receptor antagonist RO25-6981. On the other hand, preincubation of hippocampal slices with the compound KN-62, an inhibitor known to interfere with calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), totally abolished the effect of ACI on Tau phosphorylation at Ser262 epitopes. Collectively, these results provide experimental evidence that ceramides play an important role in regulating Tau phosphorylation in the hippocampus via a mechanism dependent on GluN2B receptor subunits and CaMKII activation.

Introduction

Lipids are a heterogeneous group of molecules that are ubiquitous components of cellular membranes. Several studies over the past decades led to the concept that lipids and lipid-derived molecules are more than purely structural elements and exhibit crucial functions in signal transduction and cell regulation. For instance, in the brain, one of the most abundant classes of lipids is sphingolipids.

Ceramide, which is the core structure of sphingolipids, plays an important second messenger role in a wide range of cellular functions, including proliferation, adhesion, and cell differentiation (Bartke and Hannun, 2009). Ceramide can be formed by *de novo* synthesis, by degradation of sphingomyelin or by re-acylation of sphingoid long-chain bases. Deregulation of one of these three pathways could lead to ceramide overproduction, which has been observed in a number of neurodegeneration diseases (Costantini et al., 2005; Cutler et al., 2004; Kolesnick and Kronke, 1998; Mencarelli and Martinez-Martinez, 2013). In that line, increased levels of endogenous ceramide promote the biogenesis of amyloid β -peptide via a post-translationally stabilization of the β -secretase enzyme BACE1 (Puglielli et al., 2003). The abnormal accumulation of amyloid β -peptide into senile (or amyloid) plaques is the main pathogenic event that occurs in all forms of Alzheimer's disease. Thus, it has been suggested that ceramide elevation, A β formation and Tau toxicity synergize to induce neuronal dysfunction in Alzheimer's disease (Patil et al., 2007).

The catabolism of ceramide occurs continuously in lysosomes through the activity of acid ceramidase enzyme, which catalyzes the hydrolysis of the N-acyl linkage between the sphingoid base and fatty acid of ceramide. Studies have documented that this enzyme plays important roles in limiting excessive accumulation of ceramides in cells and, in turn, avoiding the potential toxic effect of high ceramide levels. In fact, dysfunction of the human gene encoding ceramidases leads to typical lysosomal sphingolipidosis, termed Farber's disease, which is a fatal neurodegenerative condition resulting from accumulations of ceramides in lysosomes (Burek et al., 2001; Sands, 2013). The exact cascade of molecular events from ceramide accumulation to neuronal impairment in neurodegenerative diseases has not yet been clearly documented. Ceramides have recently been implicated in membrane-trafficking events involved in the maintenance of muscarinic (Gallegos et al., 2008) and glutamatergic (Tabatadze et al., 2010) receptors at the membrane surface. In particular, Wheeler et al. (Wheeler et al., 2009) established that enhanced ceramide levels increase the number of NMDA subtype of ionotropic glutamate receptors in lipid rafts of hippocampal synapses. Considerable evidence suggests

that NMDA receptor overactivation is important in mediating glutamatergic-induced toxicity in several neurodegenerative conditions (Zhou and Baudry, 2006). The present project was designed to investigate how ceramide accumulation resulting from acid ceramidase inhibition may interfere with NMDA receptor function. In addition, we focused on the possibility that ceramidase inhibition may also impact the phosphorylation of Tau proteins, which is dynamically regulated by intracellular mechanisms dependent on NMDA receptor properties (Allyson et al., 2010).

Results

ACI Increases NMDA Receptor-Mediated Synaptic Transmission

Electrophysiological experiments were performed to determine whether acid ceramidase blockade alters synaptic transmission in CA1 pyramidal cells. Towards this end, *in vitro* hippocampal slices were prepared and perfused with aCSF containing the cell-permeable ACI, d-NMAPPD, before delivering electrical stimulation to Schaffer collateral inputs in area CA1 of the hippocampus. Our experiments were conducted in slices preincubated for at least 3 h with 25 μ M d-NMAPPD, conditions that have been reported to induce massive increases of ceramide levels in numerous cell types (Raisova et al., 2002). In a first series of experiments, standard assays of changes in transmitter release were undertaken by measuring the degree of PPF. In that line, 2 stimulation pulses were delivered to Schaffer commissural fibers at several inter-stimulus intervals (50, 75, 100, 150, 200, 300 and 400 ms). As illustrated in Figure 1A, we observed that, for each inter-stimulus interval, no substantial changes occurred in mean facilitation of the second responses between control and d-NMAPPD-treated slices. Of course, this constitutes strong evidence that disturbance in transmitter release is probably not associated with acid ceramidase inhibition.

In these slices, we conducted additional recordings in which we analyzed the possibility that acid ceramidase inhibition might interfere with the postsynaptic components of synaptic transmission in CA1 pyramidal cells of the hippocampus. First, routine synaptic transmission, which is essentially driven by AMPA receptors in CA1 neurons (Muller et al., 1988), was monitored at different stimulus intensity. No substantial modification in amplitude of AMPA-mediated components was observed between control and d-NMAPPD-treated slices when stimulus intensity was increased from 50 to 400 μ A (Figure 1B).

In another set of experiments, NMDA-mediated components of synaptic transmission were isolated pharmacologically in aCSF containing a low-magnesium concentration (50 μ M), 10 μ M of the AMPA receptor antagonist CNQX and 5 μ M picrotoxin; under these conditions, Schaffer commissural fibers were also cut between areas CA1 and CA3 to avoid spiking activities. NMDA-mediated responses were then generated at various stimulus intensities in area CA1 of the hippocampus and presented as the mean amplitude of evoked fEPSPs. As reported in Figure 1C, d-NMAPPD introduction in the slice chamber provoked pronounced increase amplitude of the NMDA component. At most stimulus intensities tested (50 to 400 μ A), the amplitude of NMDA receptor responses was enhanced by more than 60% in d-NMAPPD-treated slices (25 μ M, 3 h), relative to values estimated in control slices.

We concluded, from these electrophysiological experiments, that the influence of acid ceramidase inhibition on synaptic transmission was postsynaptic in origin and specific to the NMDA subtype of glutamate receptors (see Figure 1D). In line with this notion, we found that ACI treatments were associated with significant enhancement of Tyr1472 phosphorylation of GluN2B subunits and, to a lesser degree, with GluN2B-Tyr1336 phosphorylation (Figure 2A). However, the effect was rather specific, as d-NMAPPD did not appear to accentuate phosphorylation of other epitopes controlling NMDA receptor function, such as GluN1-Ser896 and -Ser897 (Figure 2B).

ACI Accentuates Tau Phosphorylation at the Ser262 Epitope

NMDA receptors have been considered to play important roles in the pathogenesis of several brain diseases implicating, for instance, Tau dysfunctions. Consequently, we explored the possibility that d-NMAPPD-induced upregulation of NMDA responses might impact Tau phosphorylation at different epitopes in hippocampal slices kept metabolically active in oxygenated aCSF. Hippocampal slices from rats were first preincubated for 3 h with d-NMAPPD, and Tau phosphorylation was then processed according to Western blotting procedures. In initial experiments, we observed that Ser262 residues, located in the microtubule-binding domain of Tau proteins, became hyperphosphorylated when exposed to the ACI. Interestingly, a consistent feature in our experiments was the preferential modulation of Tau isoforms by d-NMAPPD, as depicted in Figure 3. Lysosomal acid ceramidase inhibition, in obvious contrast to 68-kDa Tau isoforms, produced no reliable changes in phosphorylation for the other two isoforms detected and estimated, with the help of molecular weight standards, to be around 62- and 56-kDa (Figure 3A).

Tau has been found to possess more than 84 different phosphorylation sites (Avila et al., 2004; Buee et al., 2000; Maurage et al., 2003), and we tested whether d-NMAPPD treatment also affects other phosphorylated epitopes. Figure 3B shows that preincubation of hippocampal slices with 25 μ M d-NMAPPD for 3 h failed to elicit changes in phosphorylation at Ser199-202 residues, a phosphorylation site positioned in the proline-rich domain of Tau proteins. Similarly, Western blotting experiments indicated that phosphorylation of an epitope located in the C-terminal domain of Tau, Ser396, was not substantially increased by the ACI (Figure 3C).

Tau Hyperphosphorylation is Mediated by Calcium and GluN2B Receptor Activation

Tau phosphorylation appears to be enhanced in several conditions through activation of calcium-dependent pathways (Allyson et al., 2010; De Montigny et al., 2013). Experiments were, therefore, conducted to determine whether the ability of

d-NMAPPD to engage Tau hyperphosphorylation is reduced by calcium chelation. The data presented in Figure 4A indicate that d-NMAPPD treatment failed to induce Tau hyperphosphorylation in slices exposed to the calcium chelator BAPTA (10 μ M). Interestingly, we also observed that pre-exposure of hippocampal slices to AP-5 (50 μ M) completely blocked d-NMAPPD-induced Tau phosphorylation at Ser262 epitopes (Figure 4), indicating that Tau hyperphosphorylation mainly relies on calcium influx and NMDA receptors.

Hippocampal synapses mainly contain two types of NMDA receptors, namely, NMDA receptor subtype 2A (GluN2A) and GluN2B. Here, selective antagonists were tested to study whether d-NMAPPD-induced Tau phosphorylation requires GluN2A or GluN2B receptor activation. The possibility that stimulation of GluN2B-containing NMDA receptors is responsible for upregulating Tau phosphorylation was considered first. Figure 4B illustrates that the ability of NMDA to induce Tau phosphorylation was totally abrogated in slices pre-exposed to the GluN2B antagonist RO25-6981 (1 μ M). In contrast, we noted that blockade of GluN2A-containing receptors with NVP-AAM077 (50 nM) failed to interfere with the capacity of d-NMAPPD treatments to upregulate Tau phosphorylation of Ser262 epitopes. These data being consistent with the notion that inhibition of acid ceramidase may induce Tau hyperphosphorylation by activating GluN2B-containing NMDA receptors.

Involvement of CaMKII

We finally turned our attention to the potential mechanisms underlying Tau hyperphosphorylation at Ser262 epitopes. Given our results that d-NMAPPD-induced Tau phosphorylation seems to be dependent on GluN2B receptor activation and calcium mobilization, we next investigated whether ACI can exert its action via intracellular pathways known to be regulated by calcium ions, namely, GSK3, PKC and CaMKII pathways. In these experiments, the inhibitors were applied 30 min prior to d-NMAPPD exposure to ensure optimal enzymatic inhibition. Figure 5 shows

that the ability of d-NMAPPD to upregulate Tau phosphorylation at Ser262 residues was not substantially affected by the GSK3 β inhibitor SB216763 (10 μ M) or by the PKC inhibitor chelerythrine chloride (10 μ M). Interestingly, however, we noticed that regulation of Tau phosphorylation during lysosomal acid ceramidase inhibition was totally abrogated in slices pretreated with the CaMKII inhibitor KN-62 (10 μ M).

Discussion

In recent years, it has been proposed that ceramides exert broad biological functions in cells, ranging from control of membrane receptors to the generation of signalling molecules affecting cell viability (Mencarelli and Martinez-Martinez, 2013; Morad and Cabot, 2013; Qin et al., 2010; Ruvolo, 2001). The present study identifies lysosomal acid ceramidase, an enzyme known to limit excessive ceramide accumulation in cells (Levade et al., 1995), as an important pathway regulating the NMDA type of glutamate receptors. We observed that disruption of ceramidase activity causes a selective rise in NMDA-mediated responses in hippocampal slices, likely resulting from higher levels of GluN2B receptor activity, which probably triggers Tau hyperphosphorylation via a CaMKII pathway.

Previous investigations have examined the potential role of ceramides in the regulation of membrane receptors. For instance, ceramide production has been proposed to be involved CD40, CD95 and Fc-gamma receptor clustering (Abdel Shakor et al., 2004; Grassme et al., 2002; Suchard et al., 1997). Consistent with their potential participation in the regulation of neurotransmitter systems, initial reports examining the role of ceramides in the control of acetylcholine receptors indicated that these sphingolipids are possibly involved in controlling cell-surface expression of both nicotinic (Baier and Barrantes, 2007; Barrantes, 2007; Gallegos et al., 2008) and muscarinic (Dontigny et al., 2012) subtypes of receptors. (Baier and Barrantes, 2007; Barrantes, 2007; Gallegos et al., 2008). The present study, in conjunction with previous findings (Wheeler et al., 2009), indicates that enzymatically-accumulated

ceramides also interact with mechanisms capable to favor the upregulation of NMDA-mediated responses.

Our data suggest that ceramide accumulation, resulting from lysosomal acid ceramidase inhibition, can enhance NMDA receptor activity via a mechanism involving initially GluN2B receptor phosphorylation. We demonstrated precisely that, after lysosomal acid ceramidase inhibition, phosphorylation of GluN2B-Tyr1472 was accentuated in rat hippocampal slices, whereas the same treatment was slightly effective in regulating the GluN2B-Tyr1336 epitope and totally ineffective in modulating residues specific to GluN1 subunits (Ser896 and Ser897). Several studies have shown that PKC and PKA act on GluN1-Ser896 and -Ser897, respectively, to accentuate NMDA receptor function (Chen and Roche, 2007; Cheung et al., 2001; Lau and Zukin, 2007). Our observation that lysosomal acid ceramidase inhibition has no effect on GluN1 residues suggests that these kinase pathways are not involved. Of course, additional experiments are required to determine the mechanism underlying the preferential regulation of GluN2B-Tyr1472 epitope by ACI. By activating Src family kinases, such as Src and Fyn, ceramides might have the potential to accentuate GluN2B-Tyr1472 phosphorylation (Gulbins et al., 1997). Interestingly, Fyn-mediated phosphorylation of this epitope is known to block NMDA receptor endocytosis in neurons, and one actual hypothesis is that inhibition of lysosomal acid ceramidase activity potentiates NMDA-mediated synaptic transmission by activating this pathway (Abe et al., 2005; Lau and Zukin, 2007).

Alternatively, studies have revealed that GluN2B-Tyr1472 is specifically dephosphorylated by the protein phosphatase STEP (Striatal-Enriched Protein Tyrosine Phosphatase) (Braithwaite et al., 2006; Pelkey et al., 2002). It would be particularly interesting to determine whether STEP inactivation might eventually account for GluN2B-Tyr1472 phosphorylation and potentiation of NMDA-mediated responses after lysosomal acid ceramidase inhibition. On the other hand, it is well-known that ceramides are precursor molecules of derivatives capable of influencing cell functions. For instance, intracellular accumulation of active

metabolites, such as sphingosine and sphingosine-1-phosphate, is able to modulate numerous cellular events, such as apoptosis and cell proliferation (Dickson, 2008; Nixon, 2009). In this respect, further studies are required to determine whether ceramide derivatives are inclined to modulate GluN2B-Tyr1472 phosphorylation in hippocampal slices, and, if so, what role these derivatives play in the regulation of Tau phosphorylation.

Additional evidence on the importance of lysosomal acid ceramidase activity in controlling NMDA receptor functions comes from the investigation of basal transmission in pyramidal neurons. Application of the ACI produces a substantial increase in pharmacologically isolated NMDA-mediated responses with no apparent change in AMPA-mediated transmission at CA1 synapses. Although the precise mechanism of increased NMDA receptor activity remains unknown, high ceramide levels would be expected to alter development of NMDA-dependent forms of synaptic plasticity. Accordingly, exogenously applied C6 ceramide was previously found to prevent the formation of long-term potentiation (LTP) in CA1 pyramidal cells of the hippocampus (a synaptic model of learning and memory) (Maalouf and Rho, 2008), suggesting that high ceramide levels are detrimental on synaptic plasticity. However, it is not clear at this time if this electrophysiological defect is due to the action of ceramides on expression mechanisms of LTP involving, for instance, regulation of AMPA subtype of glutamate receptors (Allyson et al., 2012). Adding to the complexity of this question are data showing that ceramide production via the neutral sphingomyelinase-2 (nSMase2) may actually favor LTP formation in the hippocampus as well as spatial memory in mice (Wheeler et al., 2009).

According to Wheeler and his group, rapid versus long term exposure to ceramides may have differential consequences for the development of synaptic plasticity. On that line, they proposed that a prolonged increase in the ceramide content of neuronal membranes may perturb NMDA receptor trafficking and could increase the susceptibility of neurons to excitotoxic death by locking NMDA receptors at the plasma membrane for prolonged periods of time (Wheeler et al., 2009). A common

mechanism that might support the development of various pathological conditions such as Alzheimer's disease and HIV-associated dementia (Haughey et al., 2004; Mielke et al., 2012). Interestingly, recent investigations have shown that basic alterations in cell metabolism selectively enhance NMDA receptor activity and engage a slow form of excitotoxicity over time (Ong et al., 2013). This contention is supported by our biochemical experiments revealing that the increased NMDA receptor activity, observed after lysosomal acid ceramidase inhibition, leads to Tau hyperphosphorylation in a GluN2B-dependent manner. From a signaling perspective, the consequent increase in Tau phosphorylation appears to involve calcium mobilization and preferentially implies phosphorylation of Tau-Ser262 by the CaMKII pathway. These results are indeed in agreement with other experiments showing that activated CaMKII preferentially targets Ser262 of Tau (Martin et al., 2013).

Conclusion

In summary, our data point to the following model: lysosomal acid ceramidase inhibition leads to ceramide accumulation, resulting in GluN2B receptor phosphorylation and selective enhancement of NMDA-mediated responses in CA1 synapses, an event that could eventually increase Tau phosphorylation by a CaMKII-dependent pathway (Figure 6). We envision that, during long-term exposure to ceramides, hippocampal neurons could eventually become more sensitive to excitotoxic damage, a scenario that will require further exploration. In view of the emerging involvement of ceramides in neurodegenerative disorders, such as Farber's disease (Levade et al., 1995) and Alzheimer's disease (Mielke et al., 2012), our observations support the notion that prevention of these lipids formation might provide a potential novel therapeutic approaches promoting neuronal survival (Arboleda et al., 2009). However, evaluation of ceramide levels within hippocampal slices was not performed in the course of the present study. In fact, additional investigations will be necessary to examine whether specific ceramide species or

their cellular location, in particular in lipid-raft domains, are mechanistically linked with the observed effects. Along this line, we recently performed in vitro experiments to test the influence of exogenously-applied ceramides on different phosphorylation sites of GluN subunits. Our preliminary observation is that exposure of rat hippocampal slices to the short-chain cell-permeable C2-ceramide could accentuate phosphorylation of GluN2B receptor subunits at the Tyr1472 epitope (data not shown). A finding which strongly supports the present contention that d-NMAPDD might indeed regulate NMDA receptor properties by enhancing endogenous production of ceramides. On the other hand, such a change in receptor properties by ceramides and/or their metabolic derivatives could theoretically favour the appearance of adverse neuropathological effects in hippocampal subregions other than CA1, and should be evaluated further.

Experimental procedures

Ethics approval

Animal care procedures were reviewed by the Institutional Animal Care Committee of Université du Québec à Trois-Rivières and found to be in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Pharmacological agents

The ACI d-NMAPDD was purchased from Cayman (Ann Arbor, MI, USA). The selective GluN2A antagonist NVP-AAM077 (NVP) was a gift from Dr. Yves Auberson (Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland). The GluN2B receptor antagonist RO25-6981 and the global NMDA receptor antagonist AP-5 were obtained from Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA), while the membrane-impermeable calcium chelator BAPTA was procured from BioMol (Plymouth, PA, USA). Inhibitors of protein kinase C (PKC; chelerythrine chloride), glycogen synthase kinase-3 (GSK3; SB216763), Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII; KN-62) and protease as well

as phosphatase inhibitor cocktails were supplied by Calbiochem (San Diego, CA, USA). 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium (CNQX) and picrotoxin were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All pharmacological agents, except NVP-AAM077 and RO25-6981, were dissolved in dimethylsulfoxide (0.05% final concentration) and mixed in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) on the day of experimentation to obtain the desired final concentration. Both selective GluN2A and GluN2B antagonists were dissolved in water.

Hippocampal slices

Male Sprague-Dawley rats (6-7 weeks of age), purchased from Charles River Laboratories (Montréal, QC, Canada), were housed for 1 week prior to any experiments in a temperature-controlled room, with free access to laboratory chow and water. For hippocampal slice preparation, the animals were anesthetized by isoflurane inhalation (Baxter Corp., Toronto, ON, Canada) and decapitated. Their brains were then rapidly removed and placed in ice-cold cutting buffer of the following composition (in mM): NaCl, 124; KCl, 3; KH₂PO₄, 1.25; CaCl₂, 1; MgSO₄, 3; NaHCO₃, 26; glucose, 10; and saturated with carbogen (95% O₂/5% CO₂). Hippocampi were dissected, and transverse 350- μ m thick slices were prepared with a McIlwain tissue chopper. The slices were placed on a nylon mesh in a liquid-gas interface recording chamber and perfused continuously at 1.5 ml/min with pre-heated (34 ± 1 °C) aCSF containing (in mM): NaCl, 124; KCl, 3; KH₂PO₄, 1.25; CaCl₂, 3; MgSO₄, 1; NaHCO₃, 26 and glucose, 10, while the upper surface of the chamber was exposed to humidified carbogen. The slices were allowed to recover for at least 1 h before experimental recordings began.

Electrophysiology

Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were evoked by a bipolar stimulating electrode and recorded in the CA1 stratum radiatum with a glass microelectrode containing 2M NaCl. Stimulation consisted of a 0.1-ms pulse

delivered every 30 s (0.033 Hz) with current intensity adjusted to obtain 40-50% of maximal fEPSPs. In some experiments, paired stimuli were given at various intervals (ranging from 50 to 400 ms), and paired-pulse facilitation (PPF) was determined by comparing the peak amplitude of the second relative to the first fEPSP ($\text{fEPSP}_2/\text{fEPSP}_1 \times 100$). In other cases, magnesium concentration in aCSF was reduced to 50 μM , with 10 μM CNQX and 5 μM picrotoxin added to reveal the component of synaptic transmission mediated by NMDA receptors. Under these conditions, Schaffer commissural fibers were cut between areas CA1 and CA3. Field EPSPs were recorded with NAC 2.0 software (Theta Burst Corp., Irvine, CA, USA). Values are presented as means \pm SEM. Drugs were prepared fresh daily in aCSF prior to being added to the recording chamber.

Western Blotting

After pharmacological treatment, hippocampal slices were dissected from brain sections and homogenized in ice-cold RIPA lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.25% sodium deoxycholate and 1 mM EDTA supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails. Protein levels were measured by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Protein lysates (40 μg) were electrophoresed on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. Separated proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, and nonspecific binding sites were blocked by incubation for 1 h at room temperature in phosphate-buffered saline, pH 7.4, containing 5% bovine serum albumin (BSA fraction V) purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA).

Then, selected primary antibodies were incubated overnight at 4 °C. After several washes with 0.1% Tween 20, the blots were incubated for 1 h at room temperature in specific secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody solution. Both primary and secondary antibodies were diluted in Tris-buffered saline/0.1% Tween 20/1% BSA. Immunoreactivity was visualized by chemiluminescence reactions and densitometric scanning with Vision Work LS software (UVP Bio-

imaging, Upland, CA, USA); band intensity was quantified by Image J (W.S. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The densitometry data were expressed as relative optical density. Labeling of β -actin was routinely performed to ensure identical protein loading on blots.

Antibodies

All antibodies reacting with Tau proteins and NMDA receptors were purchased from AbCam (Cambridge, MA, USA). The mouse polyclonal antibody Tau-5 (dilution 1:500) served to estimate total Tau protein levels in hippocampal extracts, along with rabbit polyclonal antibodies recognizing Tau phosphorylated at Ser199-202 (dilution 1:1,000), Ser262 (dilution 1:1,000) and Ser396 (dilution 1:1,000) residues. Goat antirabbit and goat antimouse peroxidase-conjugated antibodies (dilution 1:5,000) as well as SuperSignal chemiluminescent substrate kits were procured from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA). Antibody recognizing β -actin (dilution 1:5,000) was also purchased from AbCam.

Statistical analysis

Statistical significance was estimated by conventional t-test (electrophysiology) or analysis of variance, followed by the Newman-Keul's *post hoc* test (biochemistry). In most cases, the data are presented as means \pm SEM, and values are considered to be significantly different at $P < 0.05$.

Acknowledgments

The present research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada: Grant 311763 to Michel Cyr and Grant 105942 to Guy Massicotte. The authors thank Ovid Da Silva for editing this manuscript.

Figure Legends and Figures

Figure 1. Effects of d-NMAPPD on PPF, AMPA- and NMDA-mediated components of synaptic transmission.

Hippocampal slices were maintained in normal aCSF containing 25 μ M d-NMAPPD for at least 3 h prior to and during recording. **A)** PPF of fEPSPs was measured at numerous interpulse intervals ranging from 50 to 400 ms in control and d-NMAPPD-treated slices. Representative traces are shown for the 50-ms interpulse interval. Data were determined by comparing the peak amplitude of the second relative to the first fEPSP ($\text{fEPSP}_2/\text{fEPSP}_1 \times 100$) and are means \pm SEM obtained from 8 different rats (3 measurements per slice). **B)** Graph illustrating AMPA-mediated components of synaptic transmission recorded at different stimulus intensities (50 to 400 μ A) in a normal aCSF. Representative traces are shown for the 100, 250 and 400 μ A stimulus intensities. Data on the amplitude of fEPSPs recorded in control slices and slices pre-exposed to d-NMAPPD (3 h) are presented in the bar graph (means \pm SEM of 3 measurements per slice) obtained from 8 different rats. No statistical differences were observed between d-NMAPPD versus control slices (t-test). **C)** As in B, but NMDA-mediated components were pharmacologically isolated in a modified aCSF containing a low-magnesium concentration as well as antagonists for both AMPA and GABA_A receptors (see Methods). In these conditions, Schaffer-commissural fibers were also cut between areas CA1 and CA3 sectors to reduce spiking in pyramidal cells. Data relative to NMDA-mediated components of synaptic transmission recorded in control slices and slices pre-exposed to d-NMAPPD (3 h) are presented in the bar graph (means \pm SEM of 3 measurements per slice) obtained from 8 different rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, d-NMAPPD versus control values (t-test). **D)** Summary data on the amplitude of fEPSPs recorded at a stimulus intensity of 250 μ A are expressed in percentage of control values and presented in the bar graph (means \pm SEM of 3 measurements) obtained from 8 different rats.

Figure 2. D-NMAPPD treatment is associated with increased phosphorylation of GluN2B receptor subunits.

Levels of total or phosphorylated NMDA receptor subunits were estimated by Western blotting on cell extracts obtained from hippocampal slices treated with d-NMAPPD (25 μ M) for 3 h. **A)** Phosphorylated GluN2B levels at Tyr1472 and Tyr1336 epitopes were expressed relative to total GluN2B subunit levels. **B)** Phosphorylated GluN1 levels at Ser896 and Ser897 epitopes were expressed relative to total GluN1 subunit levels. Summary data are shown in the bar graph (means \pm SEM of 6 different experiments). Since these experiments were performed independently, statistical significance was estimated by conventional unpaired t-test. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, d-NMAPPD (3 h) versus the controls. Note the ability of d-NMAPPD to strongly enhance GluN2B receptor phosphorylation at residue Tyr1472.

Figure 3. D-NMAPPD treatment promotes Tau hyperphosphorylation at the Ser262 epitope.

Phosphorylated Tau levels were estimated by Western blot on cell extracts obtained from hippocampal slices treated or not with the acid ceramidase inhibitor d-NMAPPD (25 μ M, 3 h). Three Tau isoforms were consistently distinguished in immunoblots performed with antibodies directed against various phosphoepitopes (Ser262, Ser199-202 and Ser396). Summary data on pSer262 **(A)** pSer199-202 **(B)** and pSer396 **(C)** epitopes are expressed relative to total Tau (Tau5) and shown in the bar graph (means \pm SEM of 6 different experiments). For statistical analysis, one-way ANOVA was followed by Newman-Keul's *post hoc* test. *** $P < 0.001$, d-NMAPPD versus the controls. Note the strong ability of d-NMAPPD to enhance Tau phosphorylation at residue Ser262 of the 68-kDa isoform.

Figure 4. Tau hyperphosphorylation is mediated by calcium and is dependent on GluN2B receptor activation.

Phosphorylated Tau levels at Ser262 were estimated by Western blotting of cell extracts obtained from hippocampal slices. In basal conditions, slices were only exposed to the acid ceramidase inhibitor d-NMAPPD (25 μ M, 3 h). In parallel experiments, d-NMAPPD-treated slices were pre-incubated **A)** with the non-permeable calcium chelator BAPTA (10 μ M) or with the global NMDA receptor antagonist AP-5 (50 μ M); **B)** with the GluN2B receptor antagonist RO25-6981 (1 μ M) or the GluN2A receptor antagonist NVP-AAM077 (50 nM). Summary data are expressed relative to total Tau (i.e. Tau-5) levels and shown in the bar graph (means \pm SEM of 6 different experiments). For statistical analysis, one-way ANOVA was followed by Newman-Keul's *post hoc* test. *** $P < 0.001$, drug-treated versus controls.

Figure 5. Tau hyperphosphorylation is mediated by the CaMKII pathway.

As in Figure 4A, except that the GSK3 inhibitor SB216763 (SB; 10 μ M), the PKC inhibitor chelerythrine chloride (Chele; 1 μ M) and the CaMKII inhibitor (KN-62; 1 μ M) were employed. Summary data are expressed relative to total Tau (Tau-5) levels and shown in the bar graph (means \pm SEM of 6 different experiments). For statistical analysis, one-way ANOVA was followed by Newman-Keul's *post hoc* test. *** $P < 0.01$, drug-treated versus the controls.

Figure 6. Model of Tau phosphorylation during acid ceramidase inhibition.

Endogenous accumulation of ceramide is known to be rapidly observed during acid ceramidase inhibition by d-NMAPPD. Here, this inhibitor appears to accentuate NMDA receptor function through a mechanism involving GluN2B receptor phosphorylation at the Tyr1472 epitope. Consequently, calcium might selectively enhance the phosphorylation of Ser262 residues in the microtubule-binding domain of Tau via activation of the CaMKII pathway. Physiologically, acid ceramidase inactivation may induce Tau hyperphosphorylation which could have an impact on protein localization and aggregation in cells and, ultimately, on neuronal survival.

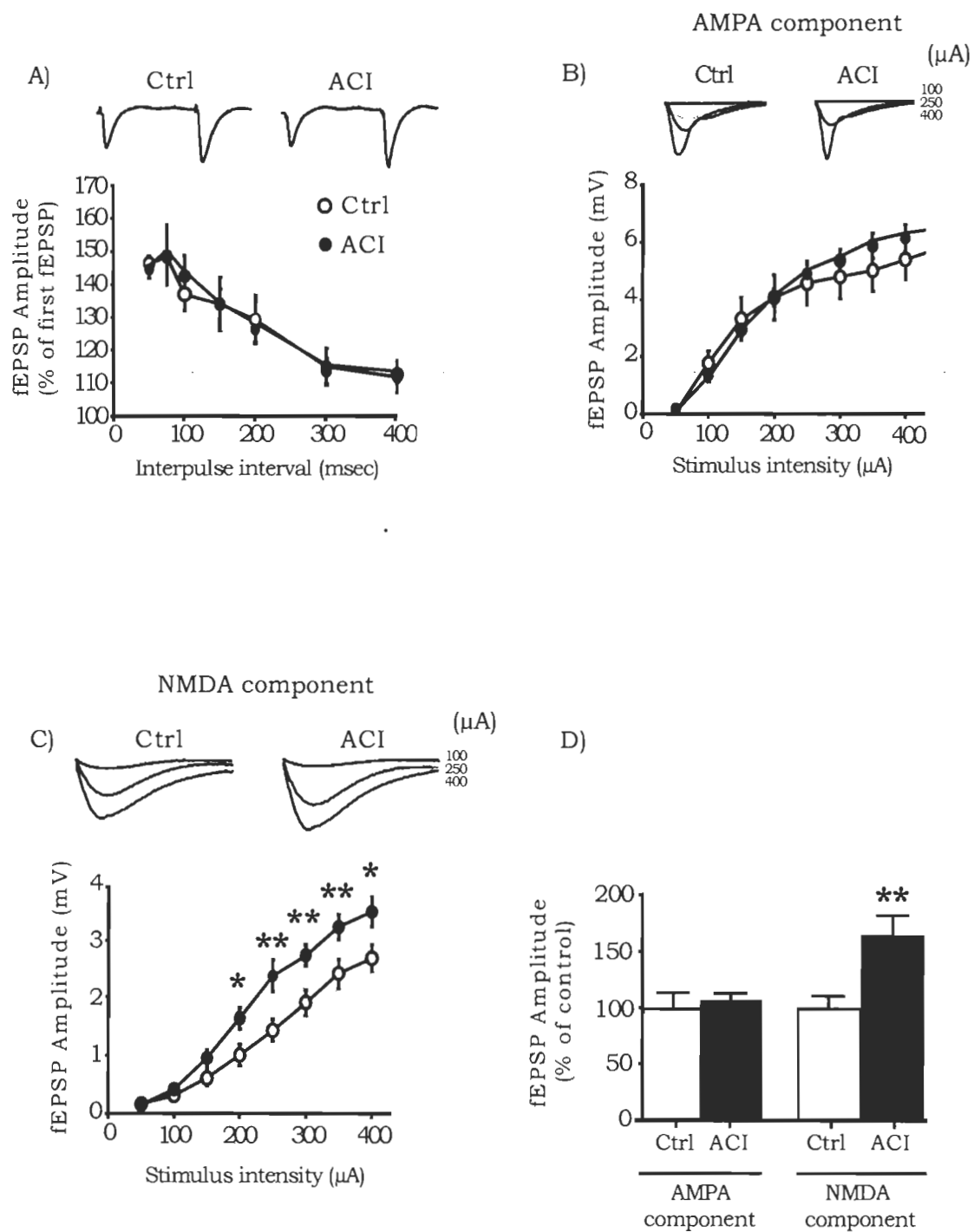


Figure 1 (Laurier-Laurin et. al)

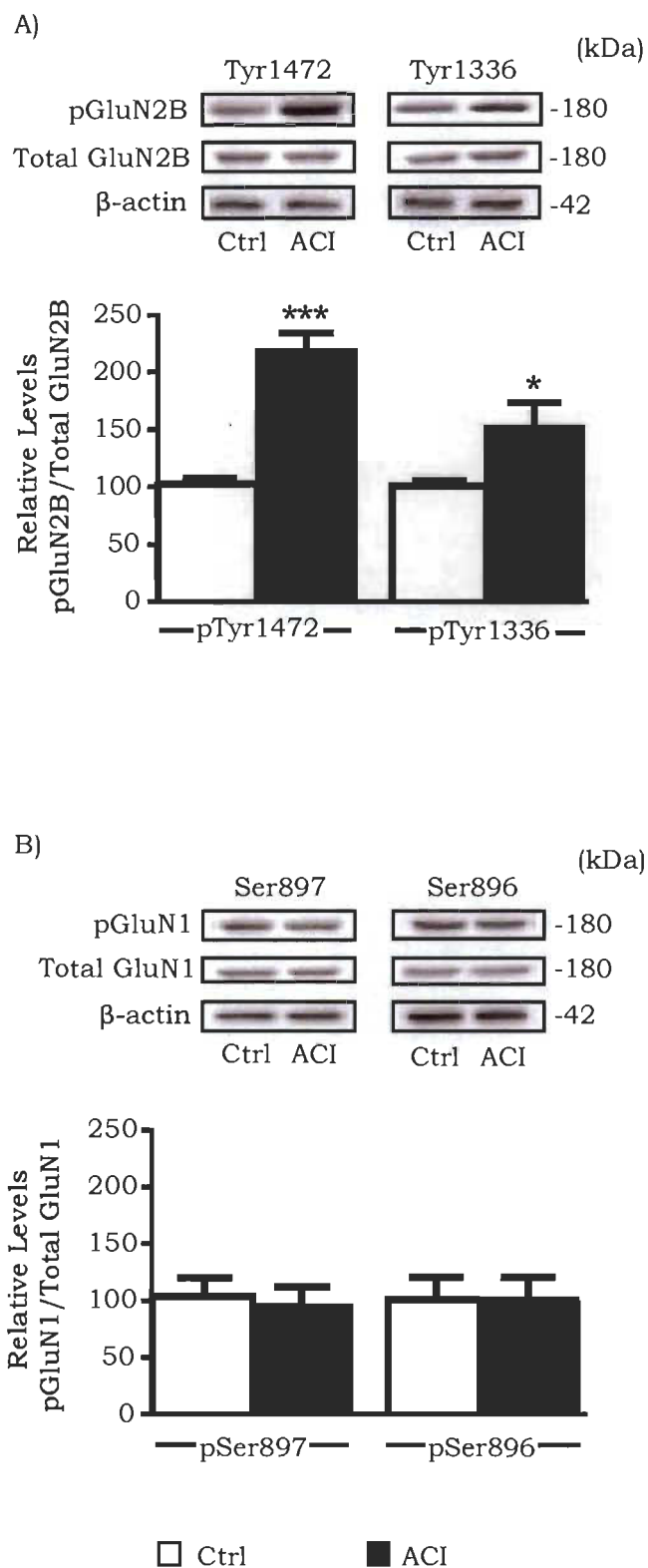


Figure 2 (Laurier-Laurin et. al)

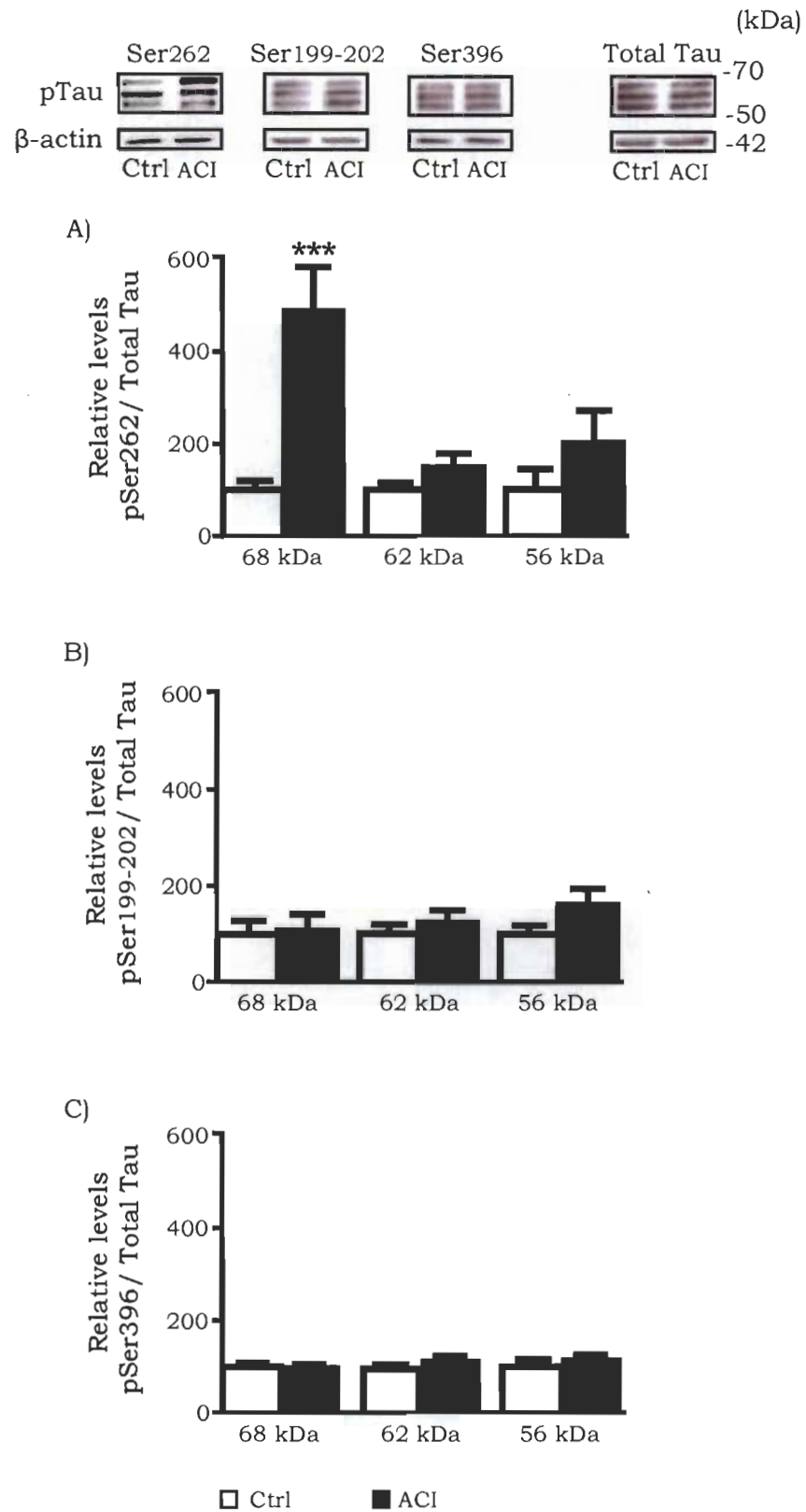


Figure 3 (Laurier-Laurin et. al)

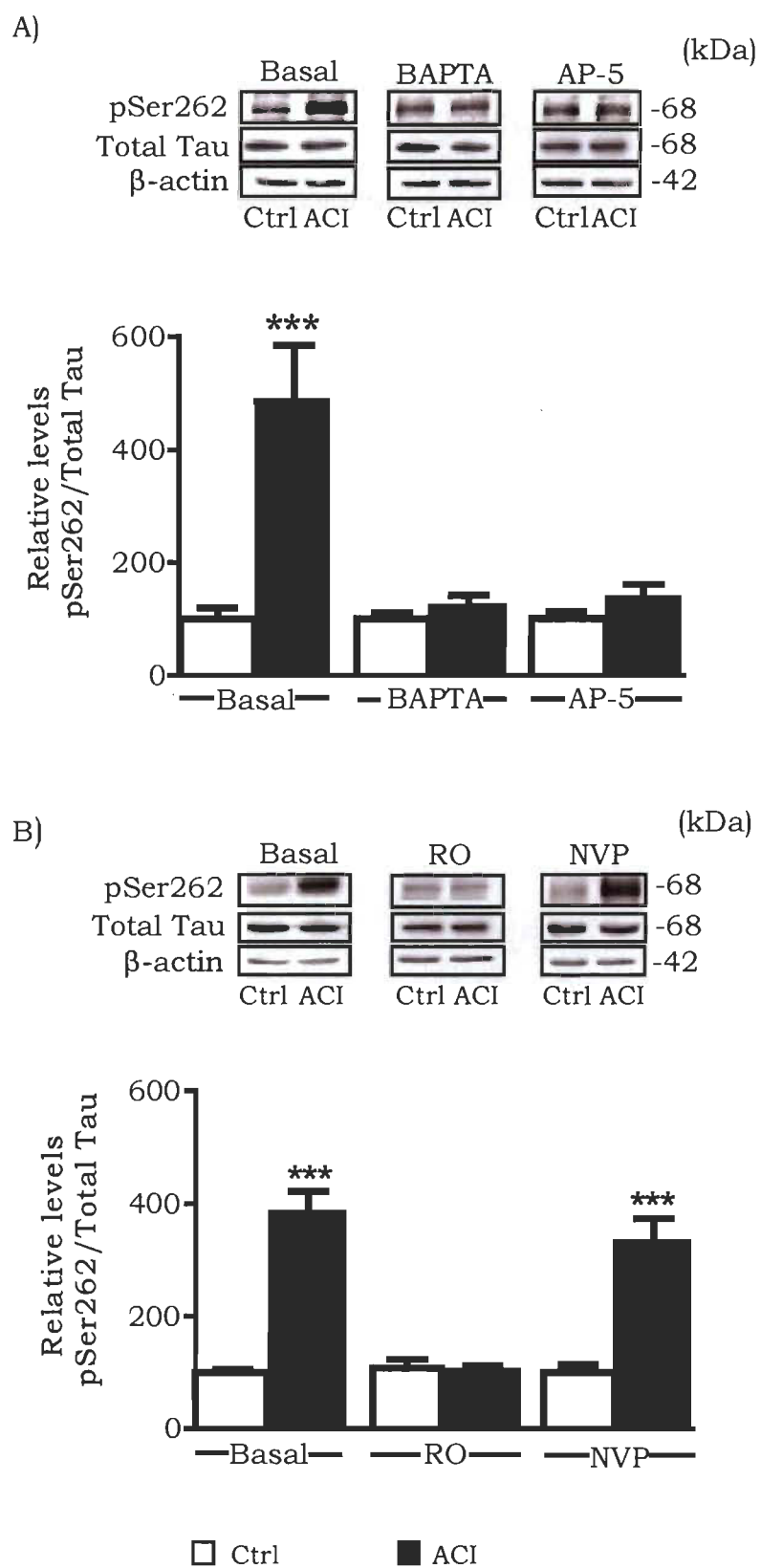


Figure 4 (Laurier-Laurin et. al)

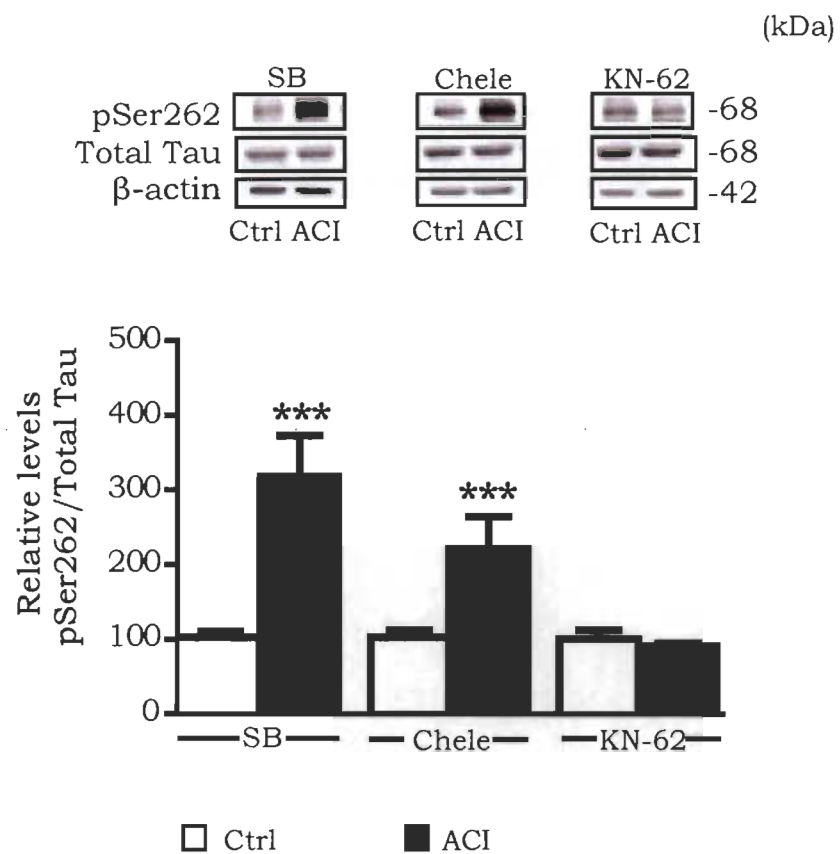


Figure 5 (Laurier-Laurin et. al)

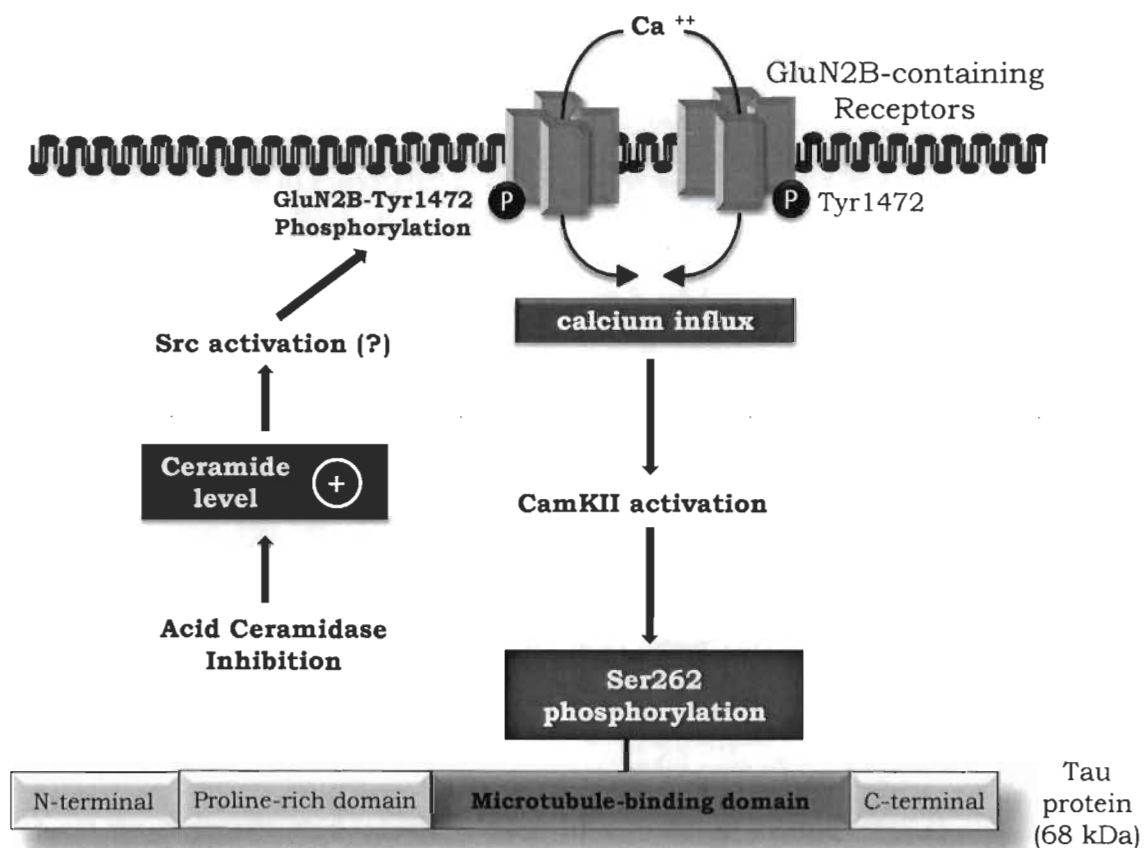


Figure 6 (Laurier-Laurin et. al)

References

- Abdel Shakor, A.B., Kwiatkowska, K., and Sobota, A. (2004). Cell surface ceramide generation precedes and controls FcγRII clustering and phosphorylation in rafts. *Journal of Biological Chemistry* 279, 36778-36787.
- Abe, T., Matsumura, S., Katano, T., Mabuchi, T., Takagi, K., Xu, L., Yamamoto, A., Hattori, K., Yagi, T., Watanabe, M., *et al.* (2005). Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain. *European Journal of Neuroscience* 22, 1445-1454.
- Allyson, J., Bi, X., Baudry, M., and Massicotte, G. (2012). Maintenance of synaptic stability requires calcium-independent phospholipase A(2) activity. *Neural Plasticity* 2012, 569149.
- Allyson, J., Dontigny, E., Auberson, Y., Cyr, M., and Massicotte, G. (2010). Blockade of NR2A-containing NMDA receptors induces Tau phosphorylation in rat hippocampal slices. *Neural Plasticity* 2010, 340168.
- Arboleda, G., Morales, L.C., Benitez, B., and Arboleda, H. (2009). Regulation of ceramide-induced neuronal death: Cell metabolism meets neurodegeneration. *Brain Research Review* 59, 333-346.
- Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M., and Hernandez, F. (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiological Reviews* 84, 361-384.
- Baier, C.J., and Barrantes, F.J. (2007). Sphingolipids are necessary for nicotinic acetylcholine receptor export in the early secretory pathway. *Journal of Neurochemistry* 101, 1072-1084.
- Barrantes, F.J. (2007). Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Neurochemistry* 103, 72-80.
- Bartke, N., and Hannun, Y.A. (2009). Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of Lipid Research* 50, S91-96.
- Braithwaite, S.P., Adkisson, M., Leung, J., Nava, A., Masterson, B., Urfer, R., Oksenberg, D., and Nikolic, K. (2006). Regulation of NMDA receptor trafficking and function by striatal-enriched tyrosine phosphatase (STEP). *European Journal of Neuroscience* 23, 2847-2856.
- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews* 33, 95-130.

- Burek, C., Roth, J., Koch, H.G., Harzer, K., Los, M., and Schulze-Osthoff, K. (2001). The role of ceramide in receptor- and stress-induced apoptosis studied in acidic ceramidase-deficient Farber disease cells. *Oncogene* 20, 6493-6502.
- Chen, B.S., and Roche, K.W. (2007). Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology* 53, 362-368.
- Cheung, H.H., Teves, L., Wallace, M.C., and Gurd, J.W. (2001). Increased phosphorylation of the NR1 subunit of the NMDA receptor following cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry* 78, 1179-1182.
- Costantini, C., Weindruch, R., Della Valle, G., and Puglielli, L. (2005). A TrkA-to-p75NTR molecular switch activates amyloid beta-peptide generation during aging. *Biochemical Journal* 391, 59-67.
- Cutler, R.G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W.A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J.C., and Mattson, M.P. (2004). Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2070-2075.
- De Montigny, A., Elhiri, I., Allyson, J., Cyr, M., and Massicotte, G. (2013). NMDA reduces Tau phosphorylation in rat hippocampal slices by targeting NR2A receptors, GSK3beta, and PKC activities. *Neural Plasticity* 2013, 261593.
- Dickson, R.C. (2008). Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *Journal of Lipid Research* 49, 909-921.
- Dontigny, E., Patenaude, C., Cyr, M., and Massicotte, G. (2012). Sphingomyelinase selectively reduces M1 muscarinic receptors in rat hippocampal membranes. *Hippocampus* 22, 1589-1596.
- Gallegos, C.E., Pediconi, M.F., and Barrantes, F.J. (2008). Ceramides modulate cell-surface acetylcholine receptor levels. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778, 917-930.
- Grassme, H., Jendrossek, V., Bock, J., Riehle, A., and Gulbins, E. (2002). Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *Journal of Immunology* 168, 298-307.
- Gulbins, E., Szabo, I., Baltzer, K., and Lang, F. (1997). Ceramide-induced inhibition of T lymphocyte voltage-gated potassium channel is mediated by tyrosine kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7661-7666.

- Haughey, N.J., Cutler, R.G., Tamara, A., McArthur, J.C., Vargas, D.L., Pardo, C.A., Turchan, J., Nath, A., and Mattson, M.P. (2004). Perturbation of sphingolipid metabolism and ceramide production in HIV-dementia. *Annals of Neurology* 55, 257-267.
- Kolesnick, R.N., and Kronke, M. (1998). Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annual Review of Physiology* 60, 643-665.
- Lau, C.G., and Zukin, R.S. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Review Neuroscience* 8, 413-426.
- Levade, T., Moser, H.W., Fensom, A.H., Harzer, K., Moser, A.B., and Salvayre, R. (1995). Neurodegenerative course in ceramidase deficiency (Farber disease) correlates with the residual lysosomal ceramide turnover in cultured living patient cells. *Journal of Neurological Sciences* 134, 108-114.
- Maalouf, M., and Rho, J.M. (2008). Oxidative impairment of hippocampal long-term potentiation involves activation of protein phosphatase 2A and is prevented by ketone bodies. *Journal of Neuroscience Research* 86, 3322-3330.
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C.M., Magnaudeix, A., Perrin, M.L., Yardin, C., and Terro, F. (2013). Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Research Review* 12, 289-309.
- Maurage, C.A., Sergeant, N., Ruchoux, M.M., Hauw, J.J., and Delacourte, A. (2003). Phosphorylated serine 199 of microtubule-associated protein tau is a neuronal epitope abundantly expressed in youth and an early marker of tau pathology. *Acta Neuropathologica* 105, 89-97.
- Mencarelli, C., and Martinez-Martinez, P. (2013). Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 181-203.
- Mielke, M.M., Bandaru, V.V., Haughey, N.J., Xia, J., Fried, L.P., Yasar, S., Albert, M., Varma, V., Harris, G., Schneider, E.B., *et al.* (2012). Serum ceramides increase the risk of Alzheimer disease: the Women's Health and Aging Study II. *Neurology* 79, 633-641.
- Morad, S.A., and Cabot, M.C. (2013). Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nature Review Cancer* 13, 51-65.
- Muller, D., Joly, M., and Lynch, G. (1988). Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science* 242, 1694-1697.
- Nixon, G.F. (2009). Sphingolipids in inflammation: pathological implications and potential therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology* 158, 982-993.

- Ong, W.Y., Tanaka, K., Dawe, G.S., Ittner, L.M., and Farooqui, A.A. (2013). Slow excitotoxicity in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 35, 643-668.
- Patil, S., Melrose, J., and Chan, C. (2007). Involvement of astroglial ceramide in palmitic acid-induced Alzheimer-like changes in primary neurons. *European Journal of Neuroscience* 26, 2131-2141.
- Pelkey, K.A., Askalan, R., Paul, S., Kalia, L.V., Nguyen, T.H., Pitcher, G.M., Salter, M.W., and Lombroso, P.J. (2002). Tyrosine phosphatase STEP is a tonic brake on induction of long-term potentiation. *Neuron* 34, 127-138.
- Puglielli, L., Ellis, B.C., Saunders, A.J., and Kovacs, D.M. (2003). Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 19777-19783.
- Qin, J., Berdyshev, E., Goya, J., Natarajan, V., and Dawson, G. (2010). Neurons and oligodendrocytes recycle sphingosine 1-phosphate to ceramide: significance for apoptosis and multiple sclerosis. *Journal of Biological Chemistry* 285, 14134-14143.
- Raisova, M., Goltz, G., Bektas, M., Bielawska, A., Riebeling, C., Hossini, A.M., Eberle, J., Hannun, Y.A., Orfanos, C.E., and Geilen, C.C. (2002). Bcl-2 overexpression prevents apoptosis induced by ceramidase inhibitors in malignant melanoma and HaCaT keratinocytes. *FEBS Letters* 516, 47-52.
- Ruvolo, P.P. (2001). Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways. *Leukemia* 15, 1153-1160.
- Sands, M.S. (2013). Farber disease: understanding a fatal childhood disorder and dissecting ceramide biology. *EMBO Molecular Medicine* 5, 799-801.
- Suchard, S.J., HinkovskaGalcheva, V., Mansfield, P.J., Boxer, L.A., and Shayman, J.A. (1997). Ceramide inhibits IgG-dependent phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 89, 2139-2147.
- Tabatadze, N., Savonenko, A., Song, H., Bandaru, V.V., Chu, M., and Haughey, N.J. (2010). Inhibition of neutral sphingomyelinase-2 perturbs brain sphingolipid balance and spatial memory in mice. *Journal of Neuroscience Research* 88, 2940-2951.
- Wheeler, D., Knapp, E., Bandaru, V.V., Wang, Y., Knorr, D., Poirier, C., Mattson, M.P., Geiger, J.D., and Haughey, N.J. (2009). Tumor necrosis factor-alpha-induced neutral sphingomyelinase-2 modulates synaptic plasticity by controlling the membrane insertion of NMDA receptors. *Journal of Neurochemistry* 109, 1237-1249.

Zhou, M., and Baudry, M. (2006). Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors. *Journal of Neuroscience* 26, 2956-2963.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Depuis plusieurs années, les neurobiologistes s'intéressent aux effets potentiellement toxiques des céramides dans le système nerveux central. Par exemple, l'accumulation de céramides dans les cerveaux des sujets souffrant de la maladie de Farber, de même que de la maladie d'Alzheimer, est mise en cause dans les processus neurodégénératifs liés au développement de ces affections (Car et al., 2012; Cozma et al., 2017; Ferreira et al., 2014; Mielke et al., 2012; Sands, 2013). S'agissant de l'implication des céramides dans la maladie d'Alzheimer, les recherches ont permis de mettre en évidence que le risque de présenter au cours de sa vie cette forme de démence est fortement corrélé avec les taux de céramides dans le plasma et le cerveau (Mielke et al., 2012; Xing et al., 2016b). Par ailleurs, la découverte montrant qu'une protéine caractéristique de la maladie d'Alzheimer (l'amyloïde- β) est à même de favoriser la production de céramides dans le cerveau a été un des faits marquants dans le champ de la neurobiologie du vieillissement (Hung et al., 2016; Kong et al., 2018; Sopher et al., 1996).

Or, la présente recherche montre que l'accumulation de céramides est en mesure de favoriser la phosphorylation de la protéine Tau dans l'hippocampe de rats, un phénomène également distinctif de la démence de type Alzheimer. Il semble que cette relation neurochimique intéresse principalement la phosphorylation du site Ser262 de la protéine Tau et implique, au préalable, l'activation des récepteurs NMDA du glutamate et de l'enzyme phosphorylante CamKII. Selon toute vraisemblance, l'accroissement de la fonction des récepteurs NMDA résulterait d'une hausse du nombre de récepteurs GluN2B, un phénomène qui pourrait sous-tendre l'effet toxique des céramides lors des maladies neurodégénératives.

4.1 Anomalies cellulaires et céramides

Les pathologies neurodégénératives comprennent une dégradation inexorable de la fonction synaptique. Or, de nombreux travaux tentent d'associer l'accumulation de céramides au dysfonctionnement de la synapse. Par exemple, on soupçonne depuis plusieurs années qu'une surabondance en céramides contribue à l'apparition du déficit cholinergique dans la maladie d'Alzheimer (Katayama et al., 1990; Yang et al., 2011). Il apparaît, de fait, que la dégradation graduelle de la transmission cholinergique au cours de la démence Alzheimer découle de la disparition des récepteurs pour l'acétylcholine dans le cerveau, un effet résultant de l'accumulation intempestive en céramides (Dontigny et al., 2012). De plus, les chercheurs croient que l'effondrement cholinergique induit par les céramides pourrait contribuer à l'apparition des problèmes cognitifs chez les sujets Alzheimer, et ce, en affectant le développement normal de la plasticité hippocampale et l'accumulation d'un agrégat neuropathogénique, la β -amyloïde.

Les données recueillies dans la présente étude font état de la possibilité que l'accumulation de céramides dans l'hippocampe de rats favorise également un dysfonctionnement neuronal susceptible d'accroître la phosphorylation de la protéine Tau. Fait intéressant, de nombreuses recherches ont démontré que l'hyperphosphorylation de la protéine Tau est une étape clef de la neurodégénérescence chez les sujets Alzheimer. Depuis plusieurs décennies, on s'intéresse grandement aux effets délétères de la protéine Tau dans la progression de la maladie d'Alzheimer et autres maladies neurodégénératives (Iaccarino et al., 2018; Iqbal et al., 2010; Medeiros et al., 2011). Du fait de sa capacité à s'agréger dans les neurones, la protéine Tau pourrait contribuer à l'affaissement du transport intracellulaire et du métabolisme énergétique (Kuznetsov and Kuznetsov, 2016; Stern et al., 2017; Terwel et al., 2002).

Les données sur la biochimie suggèrent que les effets délétères de cette protéine font suite à un état d'hyperphosphorylation, favorisant du coup l'agrégation

toxique de Tau (Ling, 2018; Stoothoff and Johnson, 2005; Wang et al., 2013). Les études disponibles dans la littérature fournissent des indications selon lesquelles l'état d'hyperphosphorylation de Tau serait dépendant de l'activation préalable des récepteurs NMDA, d'un influx d'ions calcium et éventuellement de l'activation de certaines kinases (Allyson et al., 2010; De Montigny et al., 2013; Fleming and Johnson, 1995). Or, cette vision des choses correspond assurément aux résultats obtenus dans le cadre du présent mémoire. Les conclusions tirées de nos expériences semblent suggérer que les céramides endogènes, accumulés à la suite d'une perte d'activité céramidase acide, entraînent des perturbations de phosphorylation de la protéine Tau. L'effet serait prédominant au site Ser262 de la protéine et impliquerait l'activation de l'enzyme phosphorylante CamKII.

Évidemment, la présente étude vient identifier les céramides comme jouant un rôle significatif dans l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, mais les conséquences fonctionnelles de ce phénomène restent, à l'heure actuelle, énigmatiques. De nombreux travaux soulignent l'importance du site Ser262 dans la régulation de la fonction des microtubules dans les neurones. En outre, la hausse de phosphorylation de Tau à ce site aurait comme conséquence de conférer une rigidité plus grande au cytosquelette neuronal et, de compliquer du coup, le transport et le métabolisme cellulaire (Biernat et al., 1993; Despres et al., 2017; Iijima-Ando et al., 2012). Fait intéressant, une vaste étude effectuée par l'équipe « Alzheimer & Tauopathies » de Luc Buée révèle que l'augmentation du niveau de phosphorylation a également pour effet de réduire la capacité de livraison de Tau vers le noyau, où elle agit normalement comme protéine de réparation de l'ADN. En fait, l'équipe de recherche a montré que seules les protéines Tau « déphosphorylées » sont capables de passer dans le noyau de la cellule nerveuse pour protéger son ADN. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer et de nombreuses Tauopathies où l'on observe d'importants dommages à l'ADN, l'hyperphosphorylation de la protéine Tau empêcherait sa livraison dans le noyau. Ainsi Tau ne pourrait exercer son rôle protecteur entraînant, du coup, des dommages accrus à l'ADN (Sotiropoulos et al., 2017; Sultan et al., 2011).

Il est donc permis de spéculer que la hausse de phosphorylation de Tau, induite par les céramides, puisse éventuellement réduire le contenu de Tau dans le noyau.

Par ailleurs, des chercheurs de Harvard Medical School ont publié en 2015 un article fort intéressant qui éclaire d'un jour nouveau les relations entre Tau et les maladies dégénératives (Kondo et al., 2015). Ils sont parvenus à détecter que la conformation *cis* de la protéine Tau, une forme en tortillon de la protéine, est davantage susceptible de contribuer à la dégénérescence neuronale que l'isoforme exprimée en conformation *trans* (forme détendue). Les chercheurs ont mis au point un anticorps monoclonal spécifiquement dirigé contre la forme *cis* de Tau et il sera certes intéressant de vérifier l'influence éventuelle des céramides sur la production de cette isoforme toxique de Tau.

Les découvertes sur Tau ne cessent de nous étonner. Les chercheurs ont de fait constaté que cette protéine pouvait quitter les neurones naturellement, grâce à des microparticules appelées ectosomes (DeLeo and Ikezu, 2017; Dujardin et al., 2014). Ce phénomène a été observé *in vitro* sur des cellules en culture (lignées cellulaires murines et cultures de neurones primaires), mais aussi *in vivo* chez des rats en bonne santé, en analysant le liquide interstitiel qui entoure les cellules de leur cerveau. Dans tous les cas, les chercheurs ont constaté la présence d'ectosomes contenant des protéines Tau à l'extérieur des cellules neuronales. Sur le plan physiologique, ce processus pourrait correspondre au besoin qu'aurait la cellule de se débarrasser des protéines Tau en excès et, sans grandes surprises, il n'est pas impossible d'imaginer que les protéines Tau libérées par le cerveau Alzheimer entretiennent des effets toxiques sur les neurones. Là encore, des études seront requises afin d'estimer l'effet des céramides sur la capacité des cellules à libérer Tau dans le liquide extracellulaire par l'intermédiaire des ectosomes.

4.2 Céramides et récepteurs NMDA

On étudie depuis de nombreuses années le rôle des récepteurs au glutamate dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. Les récepteurs du glutamate, sensibles à l'action de l'agoniste NMDA, ont été identifiés comme indispensables au développement de la plasticité neuronale requise pour la mémoire (Himori et al., 1990; Smith et al., 2016). Ironiquement, les recherches tentent de démontrer que l'activation intempestive des récepteurs NMDA représente une étape clef de la neurodégénérescence. Dans cette hypothèse dite d'excitotoxicité, les neurones deviendraient des victimes de la suractivation des récepteurs NMDA (Girling et al., 2018; Li et al., 2016) qui, au passage, favoriserait l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Talantova et al., 2013). La présente étude a essayé d'y voir plus clair à ce propos. Outre les changements survenus sur Tau, on constate que l'accumulation de céramides dans les tranches d'hippocampe a pour effet d'accroître la phosphorylation du récepteur GluN2B à son site Tyr1472. À l'aide de l'approche électrophysiologique basée sur l'analyse des réponses excitatrices de la région CA1 de l'hippocampe, il a pu être démontré que ce changement biochimique pouvait résulter d'une augmentation de la transmission synaptique de type NMDA.

Depuis quelque temps déjà, les données recueillies en imagerie cellulaire laissent présager que les effets physiologiques des récepteurs NMDA sont essentiellement déterminés par la localisation des sous-unités GluN2 au niveau des connexions neuronales (Gardoni et al., 2009; Hanamura et al., 2017). On suspecte, de fait, que les effets des récepteurs GluN2B sont conditionnés par leur localisation dans le complexe synaptique, soit en pré-synapse où ils peuvent moduler la libération de neurotransmetteur, soit dans la densité postsynaptique où ils traduisent la transmission synaptique. Les récepteurs peuvent également se retrouver dans les compartiments extrasynaptiques, lesquels sont activés lors du débordement synaptique ou encore par la libération de glutamate par les cellules gliales (Petràlia, 2012; Thomas et al., 2006; Zhu et al., 2018). Alors qu'il apparaît que ces récepteurs sont essentiels à la fonction synaptique et au stockage des souvenirs, on attribue

également aux récepteurs GluN2B un rôle toxique dans le développement de maladies neurodégénératives (Rammes et al., 2017; Zhang and Chergui, 2015). Par exemple, les études sur la dégénérescence neuronale nous invitent à considérer les récepteurs GluN2B comme l'un des acteurs fondamentaux déclenchant les mécanismes sous-jacents à la mort des neurones survenant durant de multiples affections comme au cours de l'ischémie cérébrale, l'épilepsie, la sclérose latérale amyotrophique et possiblement lors de la maladie d'Alzheimer (Huang et al., 2017a; Huang et al., 2017b; Lu et al., 2018).

Les études de la localisation des récepteurs NMDA indiquent que la composition des sous-unités GluN2B varie considérablement selon les compartiments (Harris and Pettit, 2007; Sanz-Clemente et al., 2013). De façon générale, les données expérimentales tentent de démontrer que les effets bénéfiques des récepteurs GluN2B sur la mémoire découlent de l'activation des récepteurs situés dans la densité postsynaptique (France et al., 2017), alors que les effets néfastes eux sont le fruit d'une stimulation intempestive des mêmes récepteurs se trouvant dans les compartiments extrasynaptiques (Garcia-Munoz et al., 2015; Gardoni et al., 2009; Loftis and Janowsky, 2003; Petralia, 2012; Zhou et al., 2015b). Dans le cadre de ce mémoire, les travaux confirment que l'accumulation de céramides dans l'hippocampe est à l'origine de changements biochimiques susceptibles d'augmenter le nombre de récepteurs GluN2B à la surface des membranes neuronales. Il est permis de penser que cette surabondance de récepteurs intéresserait principalement les compartiments extrasynaptiques du fait de l'état d'hyperphosphorylation de Tau. Une hypothèse qui est du reste supportée par nos recherches démontrant que l'effet des céramides sur Tau est complètement renversé par un inhibiteur spécifique aux récepteurs NMDA enrichis en sous-unités GluN2B.

Bien sûr, des recherches supplémentaires seront requises afin d'élucider la piste de signalisation cellulaire susceptible d'expliquer la hausse de phosphorylation des récepteurs NMDA au site Tyr1472 de GluN2B en présence de céramides.

On soupçonne d'ailleurs la voie de signalisation Src/Fyn puisque plusieurs études mettent en évidence l'action spécifique de ces kinases au site Tyr1472, alors que certains travaux montrent clairement que ces kinases sont influencées par les céramides (Attiori Essis et al., 2015; Choi et al., 2011; Li et al., 2017; Zhang et al., 2016). Une histoire à suivre.

4.3 Plasticité neuronale et céramides

Plasticité neuronale, neuroplasticité ou encore plasticité cérébrale sont des termes génériques qui décrivent les mécanismes par lesquels le cerveau est capable de se modifier lors des processus dès la phase embryonnaire ou lors d'apprentissage. Elle s'exprime par la capacité du cerveau de créer, défaire ou réorganiser les réseaux de neurones et les connexions de ces neurones. Le cerveau est ainsi qualifié de « plastique » ou de « malléable ». Ce phénomène intervient durant le développement embryonnaire, l'enfance, la vie adulte et les conditions pathologiques (lésions et maladies) (Jeong et al., 2016; Langer et al., 2013; Mattson, 2003). Il est responsable de la diversité de l'organisation fine du cerveau parmi les individus et des mécanismes de l'apprentissage et de la mémorisation. Ainsi, la plasticité neuronale est présente tout au long de la vie et est opérante avec l'expérience, dans l'apprentissage par exemple qui va faire des renforcements de réseaux et de connexions.

De très nombreuses études ont analysé les mécanismes moléculaires et cellulaires de la plasticité neuronale, en prenant comme modèle les synapses excitatrices de l'hippocampe, qui utilisent les récepteurs NMDA pour communiquer (Bartsch and Wulff, 2015; Collingridge, 1987; Rezvani, 2006; Wang et al., 2009). Sur le plan électrophysiologique, on peut y révéler le phénomène de la LTP, un processus de renforcement synaptique qui correspond à une augmentation d'amplitude de la réponse post-synaptique à la suite d'une intense activation concertée de la synapse (Chiu et al., 2018; Friedlander et al., 1990). C'est dans la

portion initiale de la corne de Hamon (ou secteur CA1) formant l'hippocampe que l'on retrouve une forme de LTP susceptible de contribuer à la formation des souvenirs hippocampiques. Chez le rongeur, par exemple, cette forme de mémoire s'avère indispensable à la réalisation de tâches durant laquelle l'animal se doit de repérer à la nage une plateforme de sortie se situant dans une piscine (labyrinthe de Morris) (Brandeis et al., 1989; Tomas Pereira and Burwell, 2015). S'agissant des effets néfastes des céramides sur le fonctionnement normal du cerveau, ils ont été peu documentés à ce jour. On sait, toutefois, que l'application exogène de céramides a pour effet de réduire le développement de la plasticité neuronale dans l'hippocampe (c.-à-d. LTP).

De manière schématique, les récepteurs NMDA, du fait de leur forte perméabilité au calcium, sont essentiels à l'induction de la LTP dans plusieurs secteurs de l'hippocampe (Shipton and Paulsen, 2014; Wiera et al., 2017), mais les recherches convergent pour impliquer les récepteurs de type AMPA du glutamate dans le maintien de ce phénomène électrophysiologique (Massicotte and Baudry, 2004). Or, nos travaux d'électrophysiologie indiquent que contrairement aux récepteurs NMDA, les récepteurs AMPA ne sont pas altérés par l'accumulation de céramides dans l'hippocampe. Il est donc permis d'imaginer que les dommages précoces à la protéine Tau ne sont pas nocifs, du moins en ce qui concerne la transmission synaptique usuelle transmise par les récepteurs AMPA. Ce faisant, on pourrait imaginer que les premières anomalies cognitives rencontrées chez les sujets Alzheimer puissent découler non pas d'une perte neuronale, mais d'une incapacité du cerveau à récupérer la mémoire préalablement emmagasinée. Les travaux d'ontogénique ont récemment démontré que l'engramme mnésique se forme bien chez des souris Alzheimer et que les problèmes cognitifs résultent essentiellement d'un problème d'extraction de la mémoire stockée (Roy et al., 2016). Sur le plan cognitif, il sera bien sûr important de vérifier si les céramides peuvent être considérées comme des acteurs néfastes dans la récupération des souvenirs.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Les fardeaux économique et humain de la démence, plus particulièrement de la maladie d'Alzheimer, se sont rapidement accrus depuis les dernières décennies, le vieillissement de la population en étant la principale cause (Lane et al., 2018). Sur le plan fondamental, on s'interroge toujours sur les processus initiateurs sous-jacents aux atteintes cognitives chez les sujets Alzheimer et autres pathologies neuronales associées à des dérèglements de la protéine Tau. Un espoir apparaît dans une direction plutôt inattendue, à savoir l'implication des lipides céramides. La présente étude insiste sur le fait que les mécanismes délétères susceptibles d'enclencher la neurodégénérescence de type Alzheimer implique potentiellement une accumulation de céramides dans l'hippocampe. Bien que cette étude soit limitée à évaluer les niveaux d'expression de certaines protéines intracellulaires par la technique de western blot, elle servira certainement de base pour des études futures permettant d'élucider les mécanismes moléculaires des maladies neurodégénératives se manifestant, principalement, par un état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau.

Rappelons-le, la formation des céramides est indispensable pour le bon fonctionnement cellulaire et, bien qu'un grand nombre de travaux leur aient été consacrés, on ignore toujours leurs implications délétères dans les maladies neurodégénératives. On savait déjà que l'accumulation de céramides dans le cerveau accompagne la production d'un peptide toxique du cerveau Alzheimer, la β -amyloïde. Outre la β -amyloïde, il semble d'après nos études que la protéine Tau soit également influencée par des taux élevés en céramides. Dans le détail, on note une hausse de phosphorylation au site Ser262 de la protéine en question; une élévation caractéristique de la démence de type Alzheimer. Expérimentalement,

il s'est avéré que non seulement la protéine Tau devient hyperphosphorylée sous l'influence des céramides, mais également les récepteurs GluN2B du glutamate que l'on considère toxiques. Cette découverte ouvre bien entendu la porte à de nouvelles théories de la neurodégénérescence et à des approches thérapeutiques inédites. L'objectif premier sera bien entendu d'identifier les espèces moléculaires de céramides capables d'affecter les récepteurs NMDA et la protéine Tau dans l'hippocampe lors du développement précoce de la démence Alzheimer.

Par-delà l'intérêt fondamental de la recherche effectuée, les conséquences pour la santé humaine de ces observations ne sont certainement pas à négliger. S'agissant de la maladie d'Alzheimer et autres Tauopathies, on soupçonne depuis plus de 25 ans qu'elles comportent des anomalies des interactions entre Tau et les ribosomes. Dans une récente étude, Jose Abisambra et ses collaborateurs ont démontré que les ribosomes s'associent plus fortement à Tau phosphorylée dans les cerveaux atteints par la maladie d'Alzheimer (Meier et al., 2016). Cette association aberrante conduit notamment à une réduction de la synthèse protéique susceptible d'expliquer le dysfonctionnement synaptique survenant lors de la maladie d'Alzheimer. Des études devront certainement être réalisées pour déterminer si les céramides se trouvent à l'origine de cette interaction inhabituelle entre Tau et ribosomes. Dans la mesure où la production de céramides affecte de très nombreux mécanismes intracellulaires, les perspectives d'interventions précises visant à limiter non seulement la production de ces médiateurs lipidiques, mais à limiter leurs effets délétères, sont cruciales.

De multiples données répertoriées dans la littérature démontrent que des perturbations dans les niveaux de céramides induites par des dérèglements enzymatiques contribuent à l'apparition de neuropathologies (Figure 5.1). Outre la maladie d'Alzheimer, ces désordres métaboliques ont été observés dans la démence associée au VIH, la leucodystrophie métachromatique, l'épilepsie et la maladie de Parkinson (Ben-David and Futerman, 2010). Détail fort intéressant à ce sujet, les éléments biochimiques et cliniques récemment compilés semblent indiquer qu'il

existe une corrélation entre les niveaux plasmatiques de céramides et les manifestations cliniques et neuropsychiatriques qui caractérisent la maladie de Parkinson (Xing et al., 2016a).

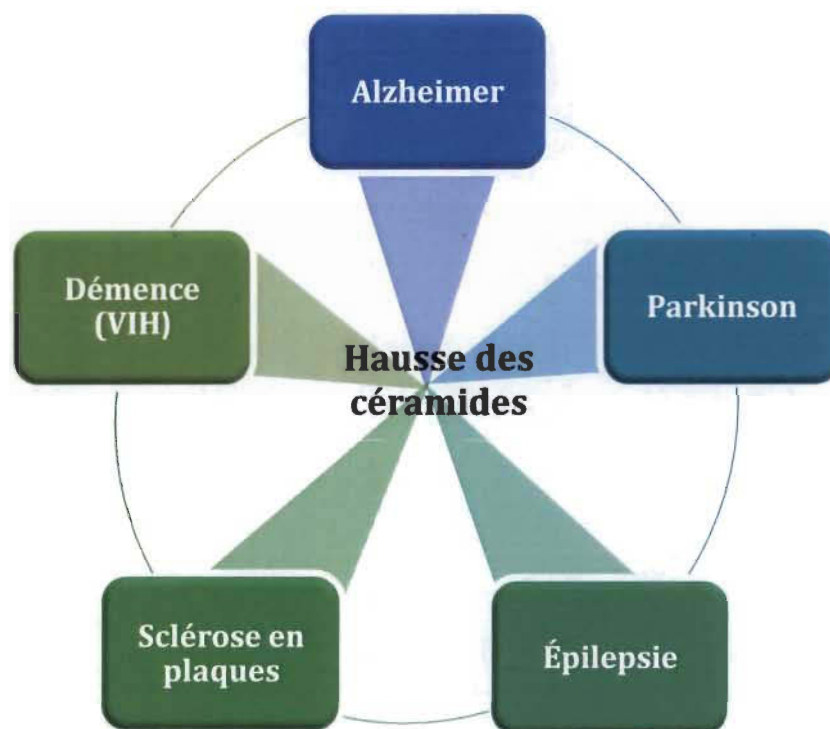


Figure 5.1 Céramides et neuropathologies.

Les lipides céramides seraient vraisemblablement au cœur du développement de certaines pathologies du cerveau. D'ailleurs, les espèces moléculaires C16 et C18 sont souvent placées au banc des accusés (Tel que modifiée de : Ben-David and Futerman, 2010).

Sur le plan biochimique, plusieurs scientifiques soupçonnent que les variations pathologiques en céramides impliquent, tout particulièrement, des anomalies enzymatiques ciblant les céramides synthases (Mullen et al., 2012). Par ailleurs, les expériences réalisées à ce jour tentent de démontrer que la formation des céramides C16 et C18 se trouve associée au développement précoce de la neurodégénérescence (Ben-David and Futerman, 2010). Bien entendu, on ignore toujours si ces espèces moléculaires sont de fait responsables de l'apparition des anomalies biochimiques observées à l'échelle des récepteurs NMDA et de la protéine Tau dans l'hippocampe. Il paraît évident que cette possibilité pourrait ouvrir la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques des maladies neurodégénératives.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel Shakor, A.B., Kwiatkowska, K., and Sobota, A. (2004). Cell surface ceramide generation precedes and controls FcγRII clustering and phosphorylation in rafts. *Journal of Biological Chemistry* 279, 36778-36787.
- Abe, T., Matsumura, S., Katano, T., Mabuchi, T., Takagi, K., Xu, L., Yamamoto, A., Hattori, K., Yagi, T., Watanabe, M., *et al.* (2005). Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain. *European Journal of Neurosciences* 22, 1445-1454.
- Abursayn, H., Al Batran, R., and Ussher, J.R. (2016). Targeting Ceramide Metabolism in Obesity. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 311, 423-435.
- Allyson, J., Bi, X., Baudry, M., and Massicotte, G. (2012). Maintenance of synaptic stability requires calcium-independent phospholipase A(2) activity. *Neural Plasticity* 2012, 569149.
- Allyson, J., Dontigny, E., Auberson, Y., Cyr, M., and Massicotte, G. (2010). Blockade of NR2A-containing NMDA receptors induces Tau phosphorylation in rat hippocampal slices. *Neural Plasticity* 2010, 340168.
- Arboleda, G., Morales, L.C., Benitez, B., and Arboleda, H. (2009). Regulation of ceramide-induced neuronal death: Cell metabolism meets neurodegeneration. *Brain Research* 59, 333-346.
- Attiori Essis, S., Laurier-Laurin, M.E., Pepin, E., Cyr, M., and Massicotte, G. (2015). GluN2B-containing NMDA receptors are upregulated in plasma membranes by the sphingosine-1-phosphate analog FTY720P. *Brain Research* 1624, 349-358.
- Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M., and Hernandez, F. (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiological Reviews* 84, 361-384.
- Baier, C.J., and Barrantes, F.J. (2007). Sphingolipids are necessary for nicotinic acetylcholine receptor export in the early secretory pathway. *Journal of Neurochemistry* 101, 1072-1084.

- Barrantes, F.J. (2007). Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Neurochemistry* 103, 72-80.
- Bartke, N., and Hannun, Y.A. (2009). Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of Lipid Research* 50, 91-96.
- Bartsch, T., and Wulff, P. (2015). The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience* 309, 1-16.
- Belousov, A.B., and Fontes, J.D. (2016). Role of neuronal gap junctions in NMDA receptor-mediated excitotoxicity and ischemic neuronal death. *Neural Regeneration Research* 11, 75-76.
- Ben-David, O., and Futerman, A. (2010). The role of the ceramide acyl chain length in neurodegeneration: involvement of ceramide synthases. *Neuromolecular Medicine* 4, 341-350.
- Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1993). Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11, 153-163.
- Bikman, B. and Summers, S. (2011). Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *Journal of Clinical Investigation* 121, 4222-4230.
- Bini, F., Frati, A., Garcia-Gil, M., Battistini, C., Granado, M., Martinesi, M., Mainardi, M., Vannini, E., Luzzati, F., Caleo, M., *et al.* (2012). New signalling pathway involved in the anti-proliferative action of vitamin D(3) and its analogues in human neuroblastoma cells. A role for ceramide kinase. *Neuropharmacology* 63, 524-537.
- Braithwaite, S.P., Adkisson, M., Leung, J., Nava, A., Masterson, B., Urfer, R., Oksenberg, D., and Nikolic, K. (2006). Regulation of NMDA receptor trafficking and function by striatal-enriched tyrosine phosphatase (STEP). *European Journal Neuroscience* 23, 2847-2856.
- Brandeis, R., Brandys, Y., and Yehuda, S. (1989). The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *International Journal of Neuroscience* 48, 29-69.
- Broskey, N.T., Obanda, D.N., Burton, J.H., Cefalu, W.T., and Ravussin, E. (2018). Skeletal muscle ceramides and daily fat oxidation in obesity and diabetes. *Metabolism* 82.

- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. Brain research. *Brain Research Reviews* 33, 95-130.
- Burek, C., Roth, J., Koch, H.G., Harzer, K., Los, M., and Schulze-Osthoff, K. (2001). The role of ceramide in receptor- and stress-induced apoptosis studied in acidic ceramidase-deficient Farber disease cells. *Oncogene* 20, 6493-6502.
- Cappellari, A.M., Torcoletti, M., Triulzi, F., and Corona, F. (2016). Nervous system involvement in Farber disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 39, 149-150.
- Car, H., Zendzian-Piotrowska, M., Fiedorowicz, A., Prokopiuk, S., Sadowska, A., and Kurek, K. (2012). The role of ceramides in selected brain pathologies: ischemia/hypoxia, Alzheimer disease. *Postepy Hig Med Dosw* 66, 295-303.
- Cayman Chemical (2010). D-NMAPPD [Image en ligne]. Repéré à <https://www.caymanchem.com/product/10006305>.
- Chen, B.S., and Roche, K.W. (2007). Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology* 53, 362-368.
- Chen, P.W., Fonseca, L.L., Hannun, Y.A., and Voit, E.O. (2015). Dynamics of the Heat Stress Response of Ceramides with Different Fatty-Acyl Chain Lengths in Baker's Yeast. *PLoS Computational Biology* 11, e1004373.
- Cheung, H.H., Teves, L., Wallace, M.C., and Gurd, J.W. (2001). Increased phosphorylation of the NR1 subunit of the NMDA receptor following cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry* 78, 1179-1182.
- Chiu, C.Q., Martenson, J.S., Yamazaki, M., Natsume, R., Sakimura, K., Tomita, S., Tavalin, S.J., and Higley, M.J. (2018). Input-Specific NMDAR-Dependent Potentiation of Dendritic GABAergic Inhibition. *Neuron* 97, 368-377.
- Choi, U.B., Xiao, S., Wollmuth, L.P., and Bowen, M.E. (2011). Effect of Src kinase phosphorylation on disordered C-terminal domain of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor subunit GluN2B protein. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 29904-29912.
- Chung, H.J., Huang, Y.H., Lau, L.F., and Huganir, R.L. (2004). Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *The Journal of Neuroscience* 24, 10248-10259.

- Coant, N., Sakamoto, W., Mao, C., and Hannun, Y.A. (2017). Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Advances in Biological Regulation* 63, 122-131.
- Collingridge, G. (1987). Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature* 330, 604-605.
- Costantini, C., Weindruch, R., Della Valle, G., and Puglielli, L. (2005). A TrkA-to-p75NTR molecular switch activates amyloid beta-peptide generation during aging. *Biochemical Journal* 391, 59-67.
- Cozma, C., Iurascu, M.I., Eichler, S., Hovakimyan, M., Brandau, O., Zielke, S., Bottcher, T., Giese, A.K., Lukas, J., and Rolfs, A. (2017). C26-Ceramide as highly sensitive biomarker for the diagnosis of Farber Disease. *Scientific Reports* 7, 1-13.
- Custom Mempro (2005). Schematic diagram of ceramidase hydrolysis process [Image en ligne]. Repéré à <https://www.creative-biostructure.com/custom-memproA2-neutral-alkaline-ceramidases-82.htm>.
- Cutler, R.G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W.A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J.C., and Mattson, M.P. (2004). Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 2070-2075.
- Czubowicz, K., and Strosznajder, R. (2014). Ceramide in the molecular mechanisms of neuronal cell death. The role of sphingosine-1-phosphate. *Molecular Neurobiology* 50, 26-37.
- De Montigny, A., Elhiri, I., Allyson, J., Cyr, M., and Massicotte, G. (2013). NMDA reduces Tau phosphorylation in rat hippocampal slices by targeting NR2A receptors, GSK3beta, and PKC activities. *Neural Plasticity* 2013, 261593.
- De Stefanis, D., Reffo, P., Bonelli, G., Baccino, F.M., Sala, G., Ghidoni, R., Codogno, P., and Isidoro, C. (2002). Increase in ceramide level alters the lysosomal targeting of cathepsin D prior to onset of apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Biological Chemistry* 383, 989-999.
- DeLeo, A.M., and Ikezu, T. (2017). Extracellular Vesicle Biology in Alzheimer's Disease and Related Tauopathy. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 2017, 29185187.

- Despres, C., Byrne, C., Qi, H., Cantrelle, F.X., Huvent, I., Chambraud, B., Baulieu, E.E., Jacquot, Y., Landrieu, I., Lippens, G., *et al.* (2017). Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 9080-9085.
- Dhawan, J., Benveniste, H., Luo, Z., Nawrocky, M., Smith, S.D., and Biegon, A. (2011). A new look at glutamate and ischemia: NMDA agonist improves long-term functional outcome in a rat model of stroke. *Future Neurology* 6, 823-834.
- Dickson, R.C. (2008). Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *Journal of Lipid Research* 49, 909-921.
- Dontigny, E., Patenaude, C., Cyr, M., and Massicotte, G. (2012). Sphingomyelinase selectively reduces M1 muscarinic receptors in rat hippocampal membranes. *Hippocampus* 22, 1589-1596.
- Doroudgar, M., and Lafleur, M. (2017). Ceramide-C16 Is a Versatile Modulator of Phosphatidylethanolamine Polymorphism. *Biophysical Journal* 112, 2357-2366.
- Dujardin, S., Begard, S., Caillierez, R., Lachaud, C., Delattre, L., Carrier, S., Loyens, A., Galas, M.C., Bousset, L., Melki, R., *et al.* (2014). Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. *PloS One* 9, 100760.
- Dulaney, J.T., Milunsky, A., Sidbury, J.B., Hobolth, N., and Moser, H.W. (1976). Diagnosis of lipogranulomatosis (Farber disease) by use of cultured fibroblasts. *The Journal of Pediatrics* 89, 59-61.
- Eliyahu, E., Park, J.H., Shtraizent, N., He, X., and Schuchman, E.H. (2007). Acid ceramidase is a novel factor required for early embryo survival. *FASEB Journal* 21, 1403-1409.
- Fanani, M.L., and Maggio, B. (2017). The many faces (and phases) of ceramide and sphingomyelin I - single lipids. *Biophysical Reviews* 9, 589-600.
- Ferrazza, R., Cogo, S., Melrose, H., Bubacco, L., Greggio, E., Guella, G., Civiero, L., and Plotegher, N. (2016). LRRK2 deficiency impacts ceramide metabolism in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478, 1141-1146.

- Ferreira, N.S., Goldschmidt-Arzi, M., Sabanay, H., Storch, J., Levade, T., Ribeiro, M.G., Addadi, L., and Futerman, A.H. (2014). Accumulation of ordered ceramide-cholesterol domains in farber disease fibroblasts. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 12, 71-77.
- Fischer, D., Mukrasch, M.D., Biernat, J., Bibow, S., Blackledge, M., Griesinger, C., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2009). Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules. *Biochemistry* 48, 10047-10055.
- Fleming, L.M., and Johnson, G.V. (1995). Modulation of the phosphorylation state of tau in situ: the roles of calcium and cyclic AMP. *The Biochemical Journal* 309, 41-47.
- France, G., Fernandez-Fernandez, D., Burnell, E.S., Irvine, M.W., Monaghan, D.T., Jane, D.E., Bortolotto, Z.A., Collingridge, G.L., and Volianskis, A. (2017). Multiple roles of GluN2B-containing NMDA receptors in synaptic plasticity in juvenile hippocampus. *Neuropharmacology* 112, 76-83.
- Friedlander, M.J., Sayer, R.J., and Redman, S.J. (1990). Evaluation of long-term potentiation of small compound and unitary EPSPs at the hippocampal CA3-CA1 synapse. *The Journal of Neuroscience* 10, 814-825.
- Gallegos, C.E., Pediconi, M.F., and Barrantes, F.J. (2008). Ceramides modulate cell-surface acetylcholine receptor levels. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778, 917-930.
- Gangoiti, P., Camacho, L., Arana, L., Ouro, A., Granado, M.H., Brizuela, L., Casas, J., Fabrias, G., Abad, J.L., Delgado, A. (2010). Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: Implications in disease. *Progress in Lipid Research* 49, 316-334.
- Garcia-Munoz, M., Lopez-Huerta, V.G., Carrillo-Reid, L., and Arbuthnott, G.W. (2015). Extrasynaptic glutamate NMDA receptors: key players in striatal function. *Neuropharmacology* 89, 54-63.
- Gardoni, F., Mauceri, D., Malinverno, M., Polli, F., Costa, C., Tozzi, A., Siliquini, S., Picconi, B., Cattabeni, F., Calabresi, P., et al. (2009). Decreased NR2B subunit synaptic levels cause impaired long-term potentiation but not long-term depression. *The Journal of Neuroscience* 29, 669-677.
- Ghidoni, R., Caretti, A., and Signorelli, P. (2015). Role of Sphingolipids in the Pathobiology of Lung Inflammation. *Mediators of Inflammation* 2015, 487508.

- Girling, K.D., Demers, M.J., Laine, J., Zhang, S., Wang, Y.T., and Graham, R.K. (2018). Activation of caspase-6 and cleavage of caspase-6 substrates is an early event in NMDA receptor-mediated excitotoxicity. *Journal of Neuroscience Research* 96, 391-406.
- Gonzalez, J., Jurado-Coronel, J.C., Avila, M.F., Sabogal, A., Capani, F., and Barreto, G.E. (2015). NMDARs in neurological diseases: a potential therapeutic target. *International Journal of Neuroscience* 125, 315-327.
- Grassme, H., Jendrossek, V., Bock, J., Riehle, A., and Gulbins, E. (2002). Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *Journal of Immunology* 168, 298-307.
- Gulbins, E., Szabo, I., Baltzer, K., and Lang, F. (1997). Ceramide-induced inhibition of T lymphocyte voltage-gated potassium channel is mediated by tyrosine kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 7661-7666.
- Hanamura, K., Washburn, H.R., Sheffler-Collins, S.I., Xia, N.L., Henderson, N., Tillu, D.V., Hassler, S., Spellman, D.S., Zhang, G., Neubert, T.A., *et al.* (2017). Extracellular phosphorylation of a receptor tyrosine kinase controls synaptic localization of NMDA receptors and regulates pathological pain. *PLoS Biology* 15, 2002457.
- Harris, A.Z., and Pettit, D.L. (2007). Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices. *The Journal of Physiology* 584, 509-519.
- Haughey, N.J., Bandaru, V.V., Bae, M., and Mattson, M.P. (2010). Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1801, 878-886.
- Haughey, N.J., Cutler, R.G., Tamara, A., McArthur, J.C., Vargas, D.L., Pardo, C.A., Turchan, J., Nath, A., and Mattson, M.P. (2004). Perturbation of sphingolipid metabolism and ceramide production in HIV-dementia. *Annals of Neurology* 55, 257-267.
- Heinrich, M., Neumeyer, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A., *et al.* (2004). Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death and Differentiation* 11, 550-563.
- Hejazi, L., Wong, J.W., Cheng, D., Proschogo, N., Ebrahimi, D., Garner, B., and Don, A.S. (2011). Mass and relative elution time profiling: two-dimensional analysis of sphingolipids in Alzheimer's disease brains. *Biochemical Journal* 438, 165-175.

- Heung, L.J., Luberto, C., Plowden, A., Hannun, Y.A., and Del Poeta, M. (2004). The sphingolipid pathway regulates Pkc1 through the formation of diacylglycerol in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 21144-21153.
- Himori, N., Watanabe, H., Akaike, N., Kurasawa, M., Itoh, J., and Tanaka, Y. (1990). Cerebral ischemia model with conscious mice. Involvement of NMDA receptor activation and derangement of learning and memory ability. *Journal of Pharmacological Methods* 23, 311-327.
- Huang, C., and Freter, C. (2015). Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 924-949.
- Huang, M., Cheng, G., Tan, H., Qin, R., Zou, Y., Wang, Y., and Zhang, Y. (2017). Capsaicin protects cortical neurons against ischemia/reperfusion injury via down-regulating NMDA receptors. *Experimental Neurology* 295, 66-76.
- Huang, Y., Shen, W., Su, J., Cheng, B., Li, D., Liu, G., Zhou, W.X., and Zhang, Y.X. (2017b). Modulating the Balance of Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Shows Positive Effects against Amyloid-beta-Induced Neurotoxicity. *Journal of Alzheimer's Disease* 57, 885-897.
- Huitema, K., van den Dikkenberg, J., Brouwers, J.F., and Holthuis, J.C. (2004). Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *Journal of the European Molecular Biology Organization* 23, 33-44.
- Hung, A.S., Liang, Y., Chow, T.C., Tang, H.C., Wu, S.L., Wai, M.S., and Yew, D.T. (2016). Mutated tau, amyloid and neuroinflammation in Alzheimer disease-A brief review. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 51, 1-8.
- Huo, T.G., Li, W.K., Zhang, Y.H., Yuan, J., Gao, L.Y., Yuan, Y., Yang, H.L., Jiang, H., and Sun, G.F. (2015). Excitotoxicity Induced by Realgar in the Rat Hippocampus: the Involvement of Learning Memory Injury, Dysfunction of Glutamate Metabolism and NMDA Receptors. *Molecular Neurobiology* 51, 980-994.
- Iaccarino, L., Tammewar, G., Ayakta, N., Baker, S.L., Bejanin, A., Boxer, A.L., Gorno-Tempini, M.L., Janabi, M., Kramer, J.H., Lazaris, A., *et al.* (2018). Local and distant relationships between amyloid, tau and neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *NeuroImage: Clinical* 17, 452-464.
- Iijima-Ando, K., Sekiya, M., Maruko-Otake, A., Ohtake, Y., Suzuki, E., Lu, B., and Iijima, K.M. (2012). Loss of axonal mitochondria promotes tau-mediated neurodegeneration and Alzheimer's disease-related tau phosphorylation via PAR-1. *PLoS Genetics* 8, 1002918.

- Iijima, K., Gatt, A., and Iijima-Ando, K. (2010). Tau Ser262 phosphorylation is critical for Abeta42-induced tau toxicity in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics* 19, 2947-2957.
- Ikura, Y., Kudo, T., Tanaka, T., Tanii, H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Takeda, M. (1998). Levels of tau phosphorylation at different sites in Alzheimer disease brain. *Neuroreport* 9, 2375-2379.
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.X., and Grundke-Iqbal, I. (2010). Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Current Alzheimer Research* 7, 656-664.
- Ito, M., Okino, N., and Tani, M. (2014). New insight into the structure, reaction mechanism, and biological functions of neutral ceramidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1841, 682-691.
- Jaffrezou, J.P., Levade, T., Bettaieb, A., Andrieu, N., Bezombes, C., Maestre, N., Vermeersch, S., Rousse, A., and Laurent, G. (1996). Daunorubicin-induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *Journal of the European Molecular Biology Organization* 15, 2417-2424.
- Jana, A., Hogan, E.L., and Pahan, K. (2009). Ceramide and neurodegeneration: susceptibility of neurons and oligodendrocytes to cell damage and death. *Journal of the Neurological Sciences* 278, 5-15.
- Jarvis, W.D., Fornari, F.A., Jr., Browning, J.L., Gewirtz, D.A., Kolesnick, R.N., and Grant, S. (1994). Attenuation of ceramide-induced apoptosis by diglyceride in human myeloid leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry* 269, 31685-31692.
- Jayadev, S., Liu, B., Bielawska, A.E., Lee, J.Y., Nazaire, F., Pushkareva, M., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (1995). Role for ceramide in cell cycle arrest. *Journal of Biological Chemistry* 270, 2047-2052.
- Jazvinscak Jembrek, M., Hof, P.R., and Simic, G. (2015). Ceramides in Alzheimer's Disease: Key Mediators of Neuronal Apoptosis Induced by Oxidative Stress and Abeta Accumulation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015, 346783.
- Jeong, J.W., Asano, E., Juhasz, C., Behen, M.E., and Chugani, H.T. (2016). Postoperative axonal changes in the contralateral hemisphere in children with medically refractory epilepsy: A longitudinal diffusion tensor imaging connectome analysis. *Human Brain Mapping* 37, 3946-3956.

- Jiang, M.C., Adimula, A., Birch, D., and Heckman, C.J. (2017). Hyperexcitability in synaptic and firing activities of spinal motoneurons in an adult mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 362, 33-46.
- Karthick, C., Periyasamy, S., Jayachandran, K.S., and Anusuyadevi, M. (2016). Intrahippocampal Administration of Ibotenic Acid Induced Cholinergic Dysfunction via NR2A/NR2B Expression: Implications of Resveratrol against Alzheimer Disease Pathophysiology. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9, 27199654.
- Katayama, S., Kito, S., Yamamura, Y., Tahara, E., and Kanazawa, I. (1990). Alteration of muscarinic receptor subtypes in CA1 field of hippocampus in senile dementia of Alzheimer type: an autoradiographic study. *Hiroshima Journal of Medical Sciences* 39, 119-124.
- Kaya, I., Brinet, D., Michno, W., Baskurt, M., Zetterberg, H., Blenow, K., and Hanrieder, J. (2017a). Novel Trimodal MALDI Imaging Mass Spectrometry (IMS3) at 10 μ m Reveals Spatial Lipid and Peptide Correlates Implicated in Abeta Plaque Pathology in Alzheimer's Disease. *ACS Chemical Neuroscience* 8, 2778-2790.
- Kaya, I., Brinet, D., Michno, W., Syvanen, S., Sehlin, D., Zetterberg, H., Blenow, K., and Hanrieder, J. (2017). Delineating Amyloid Plaque Associated Neuronal Sphingolipids in Transgenic Alzheimer's Disease Mice (tgArcSwe) Using MALDI Imaging Mass Spectrometry. *ACS Chemical Neuroscience* 8, 347-355.
- Kihara, A. (2016). Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Progress in Lipid Research* 63, 50-69.
- Kim, M.Y., Linardic, C., Obeid, L., and Hannun, Y. (1991). Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 266, 484-489.
- Kitessa, S.M., and Abeywardena, M.Y. (2016). Lipid-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle: The Chase for the Culprit Goes from Total Intramuscular Fat to Lipid Intermediates, and Finally to Species of Lipid Intermediates. *Nutrients* 8, 27483311.
- Kolesnick, R.N., and Kronke, M. (1998). Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annual Review of Physiology* 60, 643-665.

- Kondo, A., Shahpasand, K., Mannix, R., Qiu, J., Moncaster, J., Chen, C.H., Yao, Y., Lin, Y.M., Driver, J.A., Sun, Y., *et al.* (2015). Antibody against early driver of neurodegeneration cis P-Tau blocks brain injury and tauopathy. *Nature* 523, 431-436.
- Kong, J.N., Zhu, Z., Itokazu, Y., Wang, G., Dinkins, M.B., Zhong, L., Lin, H.P., Elsherbini, A., Leanhart, S., Jiang, X., *et al.* (2018). Novel function of ceramide for regulation of mitochondrial ATP release in astrocytes. *Journal of Lipid Research* 59, 488-506.
- Laaksonen, R., Ekroos, K., Sysi-Aho, M., Hilvo, M., Vihervaara, T., Kauhanen, D., Suoniemi, M., Hurme, R., Marz, W., Scharnagl, H., *et al.* (2016). Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *European Heart Journal* 37, 1967-1976.
- Lane, C.A., Hardy, J., and Schott, J.M. (2018). Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology* 25, 59-70.
- Langer, N., von Bastian, C.C., Wirz, H., Oberauer, K., and Jancke, L. (2013). The effects of working memory training on functional brain network efficiency. *Cortex* 49, 2424-2438.
- Lau, C.G., and Zukin, R.S. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature* 8, 413-426.
- Lauckner, J., Frey, P., and Geula, C. (2003). Comparative distribution of tau phosphorylated at Ser262 in pre-tangles and tangles. *Neurobiology of Aging* 24, 767-776.
- Lavezzari, G., McCallum, J., Lee, R., and Roche, K.W. (2003). Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression. *Neuropharmacology* 45, 729-737.
- Lavie, Y., Cao, H., Bursten, S.L., Giuliano, A.E., and Cabot, M.C. (1996). Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 271, 19530-19536.
- Leaver, K.R., Allbutt, H.N., Creber, N.J., Kassiou, M., and Henderson, J.M. (2008). Neuroprotective effects of a selective N-methyl-D-aspartate NR2B receptor antagonist in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 35, 1388-1394.

- Lee, I., and Kesner, R.P. (2002). Differential contribution of NMDA receptors in hippocampal subregions to spatial working memory. *Nature Neuroscience* 5, 162-168.
- Levade, T., Moser, H.W., Fensom, A.H., Harzer, K., Moser, A.B., and Salvayre, R. (1995). Neurodegenerative course in ceramidase deficiency (Farber disease) correlates with the residual lysosomal ceramide turnover in cultured living patient cells. *Journal of the Neurological Sciences* 134, 108-114.
- Li, K., Jia, H., She, X., Cui, B., Zhang, N., Chen, X., Xu, C., An, G., and Ma, Q. (2014). Role of NMDA receptors in noise-induced tau hyperphosphorylation in rat hippocampus and prefrontal cortex. *Journal of the Neurological Sciences* 340, 191-197.
- Li, L., Sengupta, A., Haque, N., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2004). Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tau and associated neurodegeneration. *FEBS Letters* 566, 261-269.
- Li, Y., Sun, W., Han, S., Li, J., Ding, S., Wang, W., and Yin, Y. (2016). IGF-1-Involved Negative Feedback of NR2B NMDA Subunits Protects Cultured Hippocampal Neurons Against NMDA-Induced Excitotoxicity. *Molecular Neurobiology* 54, 684-696.
- Lin, C.F., Chen, C.L., Chiang, C.W., Jan, M.S., Huang, W.C., and Lin, Y.S. (2007). GSK-3 β acts downstream of PP2A and the PI 3-kinase-Akt pathway, and upstream of caspase-2 in ceramide-induced mitochondrial apoptosis. *Journal of Cell Science* 120, 2935-2943.
- Lin, C.F., Tsai, C.C., Huang, W.C., Wang, Y.C., Tseng, P.C., Tsai, T.T., and Chen, C.L. (2016). Glycogen Synthase Kinase-3 β and Caspase-2 Mediate Ceramide- and Etoposide-Induced Apoptosis by Regulating the Lysosomal-Mitochondrial Axis. *PloS One* 11, 0145460.
- Ling, H. (2018). Untangling the tauopathies: Current concepts of tau pathology and neurodegeneration. *Parkinsonism & Related Disorders* 46, 34-38.
- Loftis, J.M., and Janowsky, A. (2003). The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics* 97, 55-85.

- Lopes, M.W., Soares, F.M., de Mello, N., Nunes, J.C., Cajado, A.G., de Brito, D., de Cordova, F.M., da Cunha, R.M., Walz, R., and Leal, R.B. (2013). Time-dependent modulation of AMPA receptor phosphorylation and mRNA expression of NMDA receptors and glial glutamate transporters in the rat hippocampus and cerebral cortex in a pilocarpine model of epilepsy. *Experimental Brain Research* 226, 153-163.
- Lu, F., Shao, G., Wang, Y., Guan, S., Burlingame, A.L., Liu, X., Liang, X., Knox, R., Ferriero, D.M., and Jiang, X. (2018). Hypoxia-ischemia modifies postsynaptic GluN2B-containing NMDA receptor complexes in the neonatal mouse brain. *Experimental Neurology* 299, 65-74.
- Lucci, A., Han, T.Y., Liu, Y.Y., Giuliano, A.E., and Cabot, M.C. (1999). Modification of ceramide metabolism increases cancer cell sensitivity to cytotoxics. *International Journal of Oncology* 15, 541-546.
- Maalouf, M., and Rho, J.M. (2008). Oxidative impairment of hippocampal long-term potentiation involves activation of protein phosphatase 2A and is prevented by ketone bodies. *Journal of Neuroscience Research* 86, 3322-3330.
- Madji Hounoum, B., Vourc'h, P., Felix, R., Corcia, P., Patin, F., Gueguinou, M., Potier-Cartereau, M., Vandier, C., Raoul, C., Andres, C.R., *et al.* (2016). NSC-34 Motor Neuron-Like Cells Are Unsuitable as Experimental Model for Glutamate-Mediated Excitotoxicity. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 10, 27242431.
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C.M., Magnaudeix, A., Perrin, M.L., Yardin, C., and Terro, F. (2013). Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews* 12, 289-309.
- Massicotte, G., and Baudry, M. (2004). Brain plasticity and remodeling of AMPA receptor properties by calcium-dependent enzymes. *Genetic Engineering* 26, 239-254.
- Mattson, M.P. (2003). Adventures in neural plasticity, aging, and neurodegenerative disorders aboard the CWC beagle. *Neurochemical Research* 28, 1631-1637.
- Maurage, C.A., Sergeant, N., Ruchoux, M.M., Hauw, J.J., and Delacourte, A. (2003). Phosphorylated serine 199 of microtubule-associated protein tau is a neuronal epitope abundantly expressed in youth and an early marker of tau pathology. *Acta Neuropathologica* 105, 89-97.

- Mebarek, S., Komati, H., Naro, F., Zeiller, C., Alvisi, M., Lagarde, M., Prigent, A.F., and Nemoz, G. (2007). Inhibition of de novo ceramide synthesis upregulates phospholipase D and enhances myogenic differentiation. *Journal of Cell Science* 120, 407-416.
- Medeiros, R., Baglietto-Vargas, D., and LaFerla, F.M. (2011). The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 17, 514-524.
- Meier, S., Bell, M., Lyons, D.N., Rodriguez-Rivera, J., Ingram, A., Fontaine, S.N., Mechas, E., Chen, J., Wolozin, B., LeVine, H., 3rd, *et al.* (2016). Pathological Tau Promotes Neuronal Damage by Impairing Ribosomal Function and Decreasing Protein Synthesis. *The Journal of Neuroscience* 36, 1001-1007.
- Mencarelli, C., and Martinez-Martinez, P. (2013). Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 181-203.
- Mielke, M.M., Bandaru, V.V., Haughey, N.J., Xia, J., Fried, L.P., Yasar, S., Albert, M., Varma, V., Harris, G., Schneider, E.B., *et al.* (2012). Serum ceramides increase the risk of Alzheimer disease: the Women's Health and Aging Study II. *Neurology* 79, 633-641.
- Mielke, M.M., Maetzler, W., Haughey, N.J., Bandaru, V.V., Savica, R., Deuschle, C., Gasser, T., Hauser, A.K., Graber-Sultan, S., Schleicher, E., *et al.* (2013). Plasma ceramide and glucosylceramide metabolism is altered in sporadic Parkinson's disease and associated with cognitive impairment: a pilot study. *PloS One* 9, 73094.
- Miller, A.M., Piazza, A., Martin, D.S., Walsh, M., Mandel, A., Bolton, A.E., and Lynch, M.A. (2009). The deficit in long-term potentiation induced by chronic administration of amyloid-beta is attenuated by treatment of rats with a novel phospholipid-based drug formulation, VP025. *Experimental Gerontology* 44, 300-304.
- Morad, S.A., and Cabot, M.C. (2013). Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nature Review Cancer* 13, 51-65.
- Morad, S.A., Messner, M.C., Levin, J.C., Abdelmageed, N., Park, H., Merrill, A.H., Jr., and Cabot, M.C. (2013). Potential role of acid ceramidase in conversion of cytostatic to cytotoxic end-point in pancreatic cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 71, 635-645.

- Mullen, T., Hannun, Y., and Obeid, L., (2012). Ceramide synthases at the center of sphingolipid metabolism and biology. *Journal of Biological Chemistry* 441, 789-802.
- Muller, D., Joly, M., and Lynch, G. (1988). Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science* 242, 1694-1697.
- Newcomer, J.W., Farber, N.B., and Olney, J.W. (2000). NMDA receptor function, memory, and brain aging. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 2, 219-232.
- Nivaggioni, V., Cano, A., Arnoux, I., Michel, G., and Loosveld, M. (2016). Early morphological diagnosis of Farber disease. *British Journal of Hematology* 175, 27471081.
- Nixon, G.F. (2009). Sphingolipids in inflammation: pathological implications and potential therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology* 158, 982-993.
- Noel, A., Ingrand, S., and Barrier, L. (2017). Ganglioside and related-sphingolipid profiles are altered in a cellular model of Alzheimer's disease. *Biochimie* 137, 158-164.
- Norris, C.M., Blalock, E.M., Thibault, O., Brewer, L.D., Clodfelter, G.V., Porter, N.M., and Landfield, P.W. (2006). Electrophysiological mechanisms of delayed excitotoxicity: positive feedback loop between NMDA receptor current and depolarization-mediated glutamate release. *Journal of Neurophysiology* 96, 2488-2500.
- Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A., and Hannun, Y.A. (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259, 1769-1771.
- Ogretmen, B. (2018). Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. Nature reviews. *Cancer* 18, 33-50.
- Okabe, H., and Kishimoto, Y. (1977). In vivo metabolism of ceramides in rat brain. Fatty acid replacement and esterification of ceramide. *Journal of Biological Chemistry* 252, 7068-7073.
- Okazaki, T., Bielawska, A., Bell, R.M., and Hannun, Y.A. (1990). Role of ceramide as a lipid mediator of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 265, 15823-15831.

- Ong, W.Y., Tanaka, K., Dawe, G.S., Ittner, L.M., and Farooqui, A.A. (2013). Slow excitotoxicity in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* 35, 643-668.
- Ordóñez, M., Rivera, I.G., Presa, N., and Gómez-Munoz, A. (2016). Implication of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ceramide 1-phosphate-stimulated macrophage migration. *Cellular Signalling* 28, 1066-1074.
- Osawa, Y., Uchinami, H., Bielawski, J., Schwabe, R.F., Hannun, Y.A., and Brenner, D.A. (2005). Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor- α . *Journal of Biological Chemistry* 280, 27879-27887.
- Ouro, A., Arana, L., Rivera, I.G., Ordóñez, M., Gómez-Larrauri, A., Presa, N., Simon, J., Trueba, M., Gangoiti, P., Bittman, R., *et al.* (2014). Phosphatidic acid inhibits ceramide 1-phosphate-stimulated macrophage migration. *Biochemical Pharmacology* 92, 642-650.
- Paloncyova, M., Vavrova, K., Sovova, Z., DeVane, R., Otyepka, M., and Berka, K. (2015). Structural Changes in Ceramide Bilayers Rationalize Increased Permeation through Stratum Corneum Models with Shorter Acyl Tails. *Journal of Physical Chemistry* 119, 9811-9819.
- Patil, S., Melrose, J., and Chan, C. (2007). Involvement of astroglial ceramide in palmitic acid-induced Alzheimer-like changes in primary neurons. *European Journal of Neuroscience* 26, 2131-2141.
- Pelkey, K.A., Askalan, R., Paul, S., Kalia, L.V., Nguyen, T.H., Pitcher, G.M., Salter, M.W., and Lombroso, P.J. (2002). Tyrosine phosphatase STEP is a tonic brake on induction of long-term potentiation. *Neuron* 34, 127-138.
- Pfeilschifter, J., and Huwiler, A. (2000). Ceramides as Key Players in Cellular Stress Response. *News in Physiological Sciences* 15, 11-15.
- Puglielli, L., Ellis, B.C., Saunders, A.J., and Kovacs, D.M. (2003). Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 19777-19783.
- Punnakkal, P., and Dominic, D. (2018). NMDA Receptor GluN2 Subtypes Control Epileptiform Events in the Hippocampus. *Neuromolecular Medicine* 20, 90-96.

- Qin, J., Berdyshev, E., Goya, J., Natarajan, V., and Dawson, G. (2010). Neurons and oligodendrocytes recycle sphingosine 1-phosphate to ceramide: significance for apoptosis and multiple sclerosis. *Journal of Biological Chemistry* 285, 14134-14143.
- Raisova, M., Goltz, G., Bektas, M., Bielawska, A., Riebeling, C., Hossini, A.M., Eberle, J., Hannun, Y.A., Orfanos, C.E., and Geilen, C.C. (2002). Bcl-2 overexpression prevents apoptosis induced by ceramidase inhibitors in malignant melanoma and HaCaT keratinocytes. *FEBS Letters* 516, 47-52.
- Rammes, G., Mattusch, C., Wulff, M., Seeser, F., Kreuzer, M., Zhu, K., Deussing, J.M., Herms, J., and Parsons, C.G. (2017). Involvement of GluN2B subunit containing N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors in mediating the acute and chronic synaptotoxic effects of oligomeric amyloid-beta (Abeta) in murine models of Alzheimer's disease (AD). *Neuropharmacology* 123, 100-115.
- Reich, A., and Medrek, K. (2013). Effects of narrow band UVB (311 nm) irradiation on epidermal cells. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 8456-8466.
- Roche, K.W., Standley, S., McCallum, J., Dune Ly, C., Ehlers, M.D., and Wenthold, R.J. (2001). Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nature Neuroscience* 4, 794-802.
- Rothman, S.M., and Olney, J.W. (1995). Excitotoxicity and the NMDA receptor - still lethal after eight years. *Trends in Neurosciences* 18, 57-58.
- Roy, D.S., Arons, A., Mitchell, T.I., Pignatelli, M., Ryan, T.J., and Tonegawa, S. (2016). Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature* 531, 508-512.
- Rueda, C.B., Llorente-Folch, I., Traba, J., Amigo, I., Gonzalez-Sanchez, P., Contreras, L., Juaristi, I., Martinez-Valero, P., Pardo, B., Del Arco, A., *et al.* (2016). Glutamate excitotoxicity and Ca²⁺-regulation of respiration: Role of the Ca²⁺ activated mitochondrial transporters (CaMCs). *Biochimica et Biophysica Acta* 1857, 1158-1166.
- Ruvolo, P.P. (2001). Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways. *Leukemia* 15, 1153-1160.
- Ruvolo, P.P. (2003). Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacological Research* 47, 383-392.

- Saied, E.M., and Arenz, C. (2014). Small molecule inhibitors of ceramidases. *Cellular Physiology and Biochemistry* 34, 197-212.
- Sands, M.S. (2013). Farber disease: understanding a fatal childhood disorder and dissecting ceramide biology. *EMBO Molecular Medicine* 5, 799-801.
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R.A., and Roche, K.W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *The Neuroscientist* 19, 62-75.
- Sarkar, A., Sreenivasan, Y., Ramesh, G.T., and Manna, S.K. (2004). beta-D-Glucoside suppresses tumor necrosis factor-induced activation of nuclear transcription factor kappaB but potentiates apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 279, 33768-33781.
- Schuchman, E.H. (2016). Acid ceramidase and the treatment of ceramide diseases: The expanding role of enzyme replacement therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1862, 1459-1471.
- Schweitzer, B., Singh, J., Fejtova, A., Groc, L., Heine, M., and Frischknecht, R. (2017). Hyaluronic acid based extracellular matrix regulates surface expression of GluN2B containing NMDA receptors. *Scientific Reports* 7, 1-9.
- Serpa, A., Pinto, I., Bernardino, L., and Cascalheira, J.F. (2015). Combined neuroprotective action of adenosine A1 and cannabinoid CB1 receptors against NMDA-induced excitotoxicity in the hippocampus. *Neurochemistry International* 87, 106-109.
- Shi, L., Banerjee, D., Dobierzewska, A., Sabapathi, S., Karakashian, A., Giltaiy, N., and Nikolova-Karakashian, M.N. (2016). Direct regulation of IGF Binding Protein 1 (IGFBP1) Promoter by Interleukin 1beta via insulin- and FoxO-1 independent mechanism. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 310, 612-623.
- Shipton, O.A., and Paulsen, O. (2014). GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *Biological Sciences* 369, 20130163.
- Sikora, J., Dworski, S., Jones, E.E., Kamani, M.A., Micsenyi, M.C., Sawada, T., Le Faouder, P., Bertrand-Michel, J., Dupuy, A., Dunn, C.K., et al. (2017). Acid Ceramidase Deficiency in Mice Results in a Broad Range of Central Nervous System Abnormalities. *The American Journal of Pathology* 187, 864-883.

- Skolova, B., Janusova, B., and Vavrova, K. (2016). Ceramides with a pentadecasphingosine chain and short acyls have strong permeabilization effects on skin and model lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1858, 220-232.
- Smith, A.E., Xu, Z., Lai, Y.Y., Kulkarni, P.M., Thakur, G.A., Hohmann, A.G., and Crystal, J.D. (2016). Source memory in rats is impaired by an NMDA receptor antagonist but not by PSD95-nNOS protein-protein interaction inhibitors. *Behavioural Brain Research* 305, 23-29.
- Song, J.S., and Yang, S.D. (1995). Tau protein kinase I/GSK-3 beta/kinase FA in heparin phosphorylates tau on Ser199, Thr231, Ser235, Ser262, Ser369, and Ser400 sites phosphorylated in Alzheimer disease brain. *Journal of Protein Chemistry* 14, 95-105.
- Sopher, B.L., Fukuchi, K., Kavanagh, T.J., Furlong, C.E., and Martin, G.M. (1996). Neurodegenerative mechanisms in Alzheimer disease. A role for oxidative damage in amyloid beta protein precursor-mediated cell death. *Molecular and Chemical Neuropathology* 29, 153-168.
- Sotiropoulos, I., Galas, M.C., Silva, J.M., Skoulakis, E., Wegmann, S., Maina, M.B., Blum, D., Sayas, C.L., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., *et al.* (2017). Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. *Acta Neuropathologica Communications* 5, 29187252.
- Stern, J.L., Lessard, D.V., Hoeprich, G.J., Morfini, G.A., and Berger, C.L. (2017). Phosphoregulation of Tau modulates inhibition of kinesin-1 motility. *Molecular Biology of the Cell* 28, 1079-1087.
- Stoica, B.A., Movsesyan, V.A., Lea, P.M.t., and Faden, A.I. (2003). Ceramide-induced neuronal apoptosis is associated with dephosphorylation of Akt, BAD, FKHR, GSK-3beta, and induction of the mitochondrial-dependent intrinsic caspase pathway. *Molecular and Cellular Neurosciences* 22, 365-382.
- Stoothoff, W.H., and Johnson, G.V. (2005). Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochimica et Biophysica Acta* 1739, 280-297.
- Strong, K.L., Jing, Y., Prosser, A.R., Traynelis, S.F., and Liotta, D.C. (2014). NMDA receptor modulators: an updated patent review (2013-2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 24, 1349-1366.

- Suchard, S.J., HinkovskaGalcheva, V., Mansfield, P.J., Boxer, L.A., and Shayman, J.A. (1997). Ceramide inhibits IgG-dependent phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 89, 2139-2147.
- Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Begard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., *et al.* (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *Journal of Biological Chemistry* 286, 4566-4575.
- Summers, S.A. (2006). Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Progress in Lipid Research* 45, 42-72.
- Sun, X., Tuo, Q., Liuyang, Z., Xie, A., Feng, X., Yan, X., Qiu, M., *et al.* (2016). Extrasynaptic NMDA receptor-induced tau overexpression mediates neuronal death through suppressing survival signaling ERK phosphorylation. *Cell Death & Disease* 11, 2449.
- Sun, W., Jin, J., Xu, R., Hu, W., Szulc, Z.M., Bielawski, J., Obeid, L.M., and Mao, C. (2010). Substrate specificity, membrane topology, and activity regulation of human alkaline ceramidase 2 (ACER2). *Journal of Biological Chemistry* 285, 8995-9007.
- Sun, Y., Chen, Y., Zhan, L., Zhang, L., Hu, J., and Gao, Z. (2016). The role of non-receptor protein tyrosine kinases in the excitotoxicity induced by the overactivation of NMDA receptors. *Reviews in the Neurosciences* 27, 283-289.
- Tabatadze, N., Savonenko, A., Song, H., Bandaru, V.V., Chu, M., and Haughey, N.J. (2010). Inhibition of neutral sphingomyelinase-2 perturbs brain sphingolipid balance and spatial memory in mice. *Journal of Neuroscience Research* 88, 2940-2951.
- Talantova, M., Sanz-Blasco, S., Zhang, X., Xia, P., Akhtar, M.W., Okamoto, S., Dziewczapolski, G., Nakamura, T., Cao, G., Pratt, A.E., *et al.* (2013). Aβ induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 2518-2527.
- Tanovic, A., and Alfaro, V. (2006). [Glutamate-related excitotoxicity neuroprotection with memantine, an uncompetitive antagonist of NMDA-glutamate receptor, in Alzheimer's disease and vascular dementia]. *Revista de Neurologia* 42, 607-616.
- Tell, V., and Hilgeroth, A. (2013). Recent developments of protein kinase inhibitors as potential AD therapeutics. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7, 24312003.

- Terwel, D., Dewachter, I., and Van Leuven, F. (2002). Axonal transport, tau protein, and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Medicine* 2, 151-165.
- Testai, F.D., Xu, H.L., Kilkus, J., Suryadevara, V., Gorshkova, I., Berdyshev, E., Pelligrino, D.A., and Dawson, G. (2015). Changes in the metabolism of sphingolipids after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neuroscience Research* 93, 796-805.
- Thomas, C.G., Miller, A.J., and Westbrook, G.L. (2006). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology* 95, 1727-1734.
- Tomas Pereira, I., and Burwell, R.D. (2015). Using the spatial learning index to evaluate performance on the water maze. *Behavioral Neuroscience* 129, 533-539.
- Uchida, Y. (2014). Ceramide signaling in mammalian epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1841, 453-462.
- Ueda, N. (2015). Ceramide-induced apoptosis in renal tubular cells: a role of mitochondria and sphingosine-1-phosphate. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 5076-5124.
- Van Horn, M., Sild, M., and Rhutazer, E. (2013). D-Serine as a gliotransmitter and its role in brain development and disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7, 3632749.
- Vidaurre, O.G., Haines, J.D., Katz Sand, I., Adula, K.P., Huynh, J.L., McGraw, C.A., Zhang, F., Varghese, M., Sotirchos, E., Bhargava, P., *et al.* (2014). Cerebrospinal fluid ceramides from patients with multiple sclerosis impair neuronal bioenergetics. *Brain* 137, 2271-2286.
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., *et al.* (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research* 63, 191-203.
- Wang, E., and Klauda, J.B. (2017). Molecular Dynamics Simulations of Ceramide and Ceramide-Phosphatidylcholine Bilayers. *Journal of Physical Chemistry* 121, 10091-10104.
- Wang, J., Gao, X., and Wang, Z. (2014). The physiology and pathology of microtubules-associated protein tau. *Essays in Biochemistry* 56, 111-123.

- Wang, J.Z., Xia, Y.Y., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2013). Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *Journal of Alzheimer's Disease* 33, 123-139.
- Wang, K., Xu, R., Snider, A.J., Schrandt, J., Li, Y., Bialkowska, A.B., Li, M., Zhou, J., Hannun, Y.A., Obeid, L.M., *et al.* (2016). Alkaline ceramidase 3 deficiency aggravates colitis and colitis-associated tumorigenesis in mice by hyperactivating the innate immune system. *Cell Death & Disease* 7, 2124.
- Wang, M., Uchiumi, O., Ogiso, H., Shui, Y., Zou, J., Hashizume, C., Taniguchi, M., Okazaki, T., and Kato, N. (2017). Stressful learning paradigm precludes manifestation of cognitive ability in sphingomyelin synthase-2 knockout mice. *Behavioural Brain Research* 319, 25-30.
- Wheeler, D., Knapp, E., Bandaru, V.V., Wang, Y., Knorr, D., Poirier, C., Mattson, M.P., Geiger, J.D., and Haughey, N.J. (2009). Tumor necrosis factor- α -induced neutral sphingomyelinase-2 modulates synaptic plasticity by controlling the membrane insertion of NMDA receptors. *Journal of Neurochemistry* 109, 1237-1249.
- Wiera, G., Nowak, D., van Hove, I., Dziegiel, P., Moons, L., and Mozrzymas, J.W. (2017). Mechanisms of NMDA Receptor- and Voltage-Gated L-Type Calcium Channel-Dependent Hippocampal LTP Critically Rely on Proteolysis That Is Mediated by Distinct Metalloproteinases. *The Journal of Neuroscience* 37, 1240-1256.
- Wrenger, M., Thiele, O.W., Cwik, S., and Schmid, D.O. (1982). Chemical characterization of porcine blood serum components with A and SLA activity. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics* 13, 239-244.
- Xing, Y., Tang, Y., Zhao, L., Wang, Q., Qin, W., Ji, X., Zhang, J., and Jia, J. (2016). Associations between plasma ceramides and cognitive and neuropsychiatric manifestations in Parkinson's disease dementia. *Journal of the Neurological Sciences* 370, 82-87.
- Xing, Y., Tang, Y., Zhao, L., Wang, Q., Qin, W., Zhang, J.L., and Jia, J. (2016). Plasma Ceramides and Neuropsychiatric Symptoms of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 52, 1029-1035.
- Xu, C.S., Liu, A.C., Chen, J., Pan, Z.Y., Wan, Q., Li, Z.Q., and Wang, Z.F. (2015). Overactivation of NR2B-containing NMDA receptors through entorhinal-hippocampal connection initiates accumulation of hyperphosphorylated tau in rat hippocampus after transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neurochemistry* 134, 566-577.

- Xu, D., Chen, H., Mak, S., Hu, S., Tsim, K.W., Hu, Y., Sun, Y., Zhang, G., Wang, Y., Zhang, Z., *et al.* (2016). Neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity and induction of neurite outgrowth by T-006, a novel multifunctional derivative of tetramethylpyrazine in neuronal cell models. *Neurochemistry international* 99, 194-205.
- Yadav, R.S., and Tiwari, N.K. (2014). Lipid integration in neurodegeneration: an overview of Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology* 50, 168-176.
- Zhang, W.B., Ross, P.J., Tu, Y., Wang, Y., Beggs, S., Sengar, A.S., Ellis, J., and Salter, M.W. (2016). Fyn Kinase regulates GluN2B subunit-dominant NMDA receptors in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Scientific Reports* 6, 23837.
- Zhang, X., and Chergui, K. (2015). Dopamine depletion of the striatum causes a cell-type specific reorganization of GluN2B- and GluN2D-containing NMDA receptors. *Neuropharmacology* 92, 108-115.
- Zhang, X., Kitatani, K., Toyoshima, M., Ishibashi, M., Usui, T., Minato, J., Egiz, M., Shigeta, S., Fox, T., Deering, T., *et al.* (2018). Ceramide Nanoliposomes as a MLKL-Dependent, Necroptosis-Inducing, Chemotherapeutic Reagent in Ovarian Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 17, 50-59.
- Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., Allegood, J.C., Liu, Y., Peng, Q., *et al.* (2006). Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758, 1864-1884.
- Zhou, M., and Baudry, M. (2006). Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors. *Journal of Neuroscience* 26, 2956-2963.
- Zhou, X., Chen, Z., Yun, W., Ren, J., Li, C., and Wang, H. (2015a). Extrasynaptic NMDA Receptor in Excitotoxicity: Function Revisited. *The Neuroscientist* 21, 337-344.
- Zhou, X., Chen, Z., Yun, W., and Wang, H. (2015b). NMDA receptor activity determines neuronal fate: location or number? *Reviews in the Neurosciences* 26, 39-47.
- Zhu, L., Yang, L., Zhao, X., Liu, D., Guo, X., Liu, P., Chi, T., Ji, X., and Zou, L. (2018). Xanthoceraside modulates NR2B-containing NMDA receptors at synapses and rescues learning-memory deficits in APP/PS1 transgenic mice. *Psychopharmacology* 235, 337-349.

Zielonka, M., Garbade, S.F., Kolker, S., Hoffmann, G.F., and Ries, M. (2017). A cross-sectional quantitative analysis of the natural history of Farber disease: an ultra-orphan condition with rheumatologic and neurological cardinal disease features. *Genetics in Medicine* 133, 29048419.